

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour obtenir le grade de
DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

par

FRANÇOIS STOEBER

PREMIÈRE THÈSE :

**ÉTUDES DES PROPRIÉTÉS ET DE LA BIOSYNTHÈSE
DE LA GLUCURONIDASE ET DE LA GLUCURONIDE-PERMÉASE
CHEZ ESCHERICHIA COLI**

DEUXIÈME THÈSE :

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le *29 mai* 1961 devant la Commission d'examen :

M. E. LEDERER	Président
M. J. MONOD	} Examineurs
M. A LWOFF.....	

C. D. U. ET S. E. D. E. S.
PARIS

1961



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550206_0005

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour obtenir le grade de
DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

par

FRANÇOIS STOEBER

PREMIÈRE THÈSE :

**ÉTUDES DES PROPRIÉTÉS ET DE LA BIOSYNTHÈSE
DE LA GLUCURONIDASE ET DE LA GLUCURONIDE-PERMÉASE
CHEZ ESCHERICHIA COLI**

DEUXIÈME THÈSE :

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 1961 *devant la Commission d'examen :*

M. E. LEDERER	<i>Président</i>
M. J. MONOD	} <i>Examineurs</i>
M. A. LWOFF	

C. D. U. ET S. E. D. E. S.
PARIS

1961



T H E S E S

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES

DE L' UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir

le grade de Docteur ès Sciences Naturelles

par

FRANCOIS STOEBER

1ère Thèse - Etude des propriétés et de la biosynthèse de la
glucuronidase et de la glucuronide-perméase chez
Escherichia coli.

2ème Thèse - Propositions données par la faculté

soutenues le

1961 devant la commission d'examen

M. E. LEDERER

Président

M. J. MONOD

M. A. LWOFF

{
Examineurs

(Janvier 1961)

FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

- PROFESSEURS -

Doyen J. PERES

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure	THELLIER	T	Physique du Globe
DE BROGLIE	T	Théories physiques	L'HERITIER	T	Biologie générale (Orsay)
PRENANT	T	Anatomie et histologie comparées	GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay)
PERES	T	Mécanique des fluides et applications	PONCIN	T	Mécanique générale
BOURCART	T	Géographie physique et Géologie dynamique	DUBREIL	T	Arithmétique et Théorie des Nombres
PLANTEFOL	T	Botanique	QUELET	T	Chimie Organique
GRASSE	T	Evolution des êtres organisés	CAGNIARD	T	Géophysique appliquée
PREVOST	T	Chimie organique	CHAMPETIER	T	Chimie Macromoléculaire
BOULIGAND	T	Analyse appliquée à la Géométrie	CUVILLIER	T	Micropaléontologie
CHAUDRON	T	Chimie appliquée	JUNG	T	Pétrographie
WYART	T	Minéralogie et Cristallog.	TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique
TEISSIER	T	Zoologie	WIEMANN	T	Chimie organique et struct.
MANGENOT	T	Biologie vég. (Orsay)	JACQUINOT	T	Spectroscopie (ORSAY)
AUGER	T	Physique quantique et Relativité	VASSY	T	Physique de l'Atmosphère
MONNIER	T	Physiologie des Fonctions	DESTOUCHES	T	Théories Physiques
PIVETEAU	T	Paléontologie	PRUVOST	T	Géologie
ROCARD	T	Physique (E.N.S.)	AMIEL	T	Chimie des Solides
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.)	HOCART	T	Minéralogie et Cristallogr.
LAFFITTE	T	Chimie Générale	J.P.MATHIEU	T	Recherches Physiques
FAVARD	T	Géométrie supérieure	COUTEAUX	T	Biol. Animale (P.C.B.)
COULOMB	T	Physique du Globe	MAY	T	Zoologie (ORSAY)
Mlle COUSIN	T	Biologie	CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie
CHRETIEN	T	Chimie minérale	FELDMANN	T	Biologie Végétale (P.C.B.)
DRACH	T	Zoologie	GUINIER	T	Physique des Solides (ORSAY)
KASTLER	T	Physique (E.N.S.)	JOST	T	Physiologie comparée
EPHRUSSI	T	Génétique	FORTET	T	Calcul des Probabilités
RIVIERE	T	Géologie (Orsay)	SCHWARTZ	T	Calcul diff. et Intégral
GAUTHERET	T	Biologie (P.C.B.)	CHOUARD	T	Physiologie Végétale
LUCAS R.	T	Recherches Physiques	MALAVARD	T	Aviation (Techn. Aéronaut.)
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire	BRELOT	T	Calcul différentiel
ARNULF	T	Optique appliquée	NORMANT	T	Synthèse organique générale
MORAND	T	Physique Enseignement	BENARD	T	Chimie (E.N.S. .C.P.)
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.)	BUVAT	T	Botanique (E.N.S.)
FORTIER	T	Mécan. expérimentale des Fluides	DUGUE	T	Statistiques Mathématiques
DANJON	T	Astronomie	SOULAIRAC	T	Psychophysiologie
PETIT	T	Biologie maritime	ULRICH	T	Physiologie Végétale (E.N.S.)
QUENEY	T	Météorologie et dyna- mique atmosphérique	MARECHAL	T	Optique théorique et Appl.
GALLIEN	T	Embryologie	KIRMANN	T	Théories Chimiques
EICHHORN	T	Biologie Végétale (P.C.B.)	CHADEFAUD	T	Botanique
DE CUGNAC	T	Biologie Végétale (S.P.C.N.)	Mlle LE BRETON	T	Physiologie
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie Physique	SALEM	T	Mathématiques générales
			LELONG	T	Mathématiques générales
			DEVILLERS	T	Anatomie et Histologie comparé
			EHRESMANN	T	Topologie algébrique
			FRANCON	T	Physique (S.P.C.N.)
			GLANCEAUD	T	Géographie physique et géologi dynamique

GODEMENT	T	Mathématiques (M.P.C.)	DELANGÉ	T	Mathématiques (ORSAY)
PISOT	F	Calcul des Probabilités	DENY	T	Math.générales (ORSAY)
ROCH	T	Géologie	GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides
SCHATZMAN	T	Astrophysique	LUCAS G.	T	Géologie
TERMIER	T	Paléontologie stratigraphique	ALLARD	T	Chimie Physique
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales	BERTHELOT	T	Physique Fondamentale des Hautes Energies (ORSAY)
LENNUIER	T	Physique (P.C.B.)	BRICARD	T	Météorologie
RIZET	T	Génétique (ORSAY)	Mme ALBE-FESSARD		Psychophysiologie
ROUTHIER	T	Géologie appliquée	FRIEDEL		Physique des Solides (ORSAY)
Mme TONNELAT	T	Relativité	M. JULIA		Chimie Organ. Structurale
DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.)	LENDER		Biologie Animale (SPCN) ORSAY
SOUCHAY	T	Chimie (P.C.B.)	MAGAT		Physico-chimie des rayonnements
AIGRAIN	T	Electrotechnique générale	QUINTIN Mlle	T	Electrochimie
BRUSSET		Chimie minérale	MONOD	T	Biochimie Cellulaire
M. LEVY	T	Physique théorique des hautes Energies (ORSAY)	BENOIT	T	Physiol. Anim. (ORSAY)
Mme CHAIX	T	Chimie biologique	DE POSSEL	T	Analyse numérique
Mme HUREL-PY		Biologie Végétale (P.C.B.)	CHARLOT	T	Chimie analytique
PIAUX	T	Chimie (S.P.C.N.)	HAISSINSKY	T	Radiochimie
BRUN	T	Mécan. expérimentale des fluides	LEMÉE	T	Physiol. B.M.P.V. (ORSAY)
LEDERER	T	Chimie biologique	GUERIN	T	Chimie (ORSAY)
Mme DUBREIL	T	Mathématiques (Agrég.)	CHATELET M.		Chimie (P.C.B.)
Mme LELONG	T	Mathématiques (E.N.S.)	JEAN		Physique (ORSAY)
BELLAIR	T	Géologie -(S.P.C.N.)	MATTLER	T	Physique (ORSAY)
COTTE	T	Physique (M.P.C.)	MICHEL Louis		Physique théor. (ORSAY)
DUBOIS J.E.	T	Chimie (M.P.C.)	RUMPF		Chimie (P.C.B.)
LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.)	BERGERARD		Biol. Anim. (SPCN) (ORSAY)
MICHEL André	T	Chimie Minérale (ORSAY)	BERTEIN		Electronique (ORSAY)
OLMER	T	Energétique générale	BOUSSIÈRES		Chimie des Radioéléments (ORSAY)
ROUAULT	T	Physique	Mme COUTURE		Thermodynamique et Mécanique Physique
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée	ELLENBERGER		Géologie appliquée
BARCHEWITZ	T	Chimie Physique	FRANC		Biol. Animale (P.C.B.)
BROSSEL	T	Physique atomique	SCHNELL		Botanique tropicale (ORSAY)
BUSSE		Biologie animale (P.C.B.)	STOLKOWSKI		Biol. Animale (P.C.B.)
CAMUS		Biologie végétale (P.C.B.)	ACHER		Chimie Bio l. (ORSAY)
CASTAING		Physique (ORSAY)	BAUDOIN		Biologie
CURIEN	T	Minéralogie et Cristallogr.	BEAUMONT		Biologie animale
MOYSE	T	Physiologie végét. (ORSAY)	BLAMONT		Géophysique Ionosphère
PANNETIER	T	Chimie (ORSAY)	BOURREAU		Biologie Végétale (S.P.C.N.) (ORSAY)
POSSOMPES	T	Biologie Animale (P.C.B.)	CURIE D.		Physique (M.G.P.)
PULLMANN		Chimie théorique	DURAND-DELGA		Géologie
TEILLAC	T	Physique Nucléaire et Radioactivité (ORSAY)	FREON		Chimie organique (ORSAY)
TONNELAT		Biologie physico-chim.	HELLER		Physiologie végétale
VILLE	T	Econométrie	TORTRAT		Calcul des Probabilités
WILLEMART		Chimie (P.C.B.)	CAILLIEUX		Géologie (S.P.C.N.)
DODE	T	Chimie (ORSAY)	MAGNAN	T	Physique (P.C.B.)
FREYMAN	T	Physique (S.P.C.N.)	DAUDEL		Mécanique Ondulatoire appliquée à la chimie théorique et à la Physique nucléaire.
GUINOCHET	T	Biologie Vég. (ORSAY)	Mlle FOURCROY		Biologie Végétale (S.P.C.N.)
ROLLET	T	Chimie (P.C.B.)	BARRAUD		Physiologie cellulaire
Mlle JOSIEN	T	Chimie (P.C.B.)			
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes			
ARNOULT	T	Electronique (ORSAY)			
CHAPELLE	T	Physique (ORSAY)			

NOIROT	Evolution des êtres organisés
Mme FOURES-BRUHAT	T Mécanique Analytique et Mécanique céleste
Mlle VEIL	Physiologie Générale
LWOFF	T Microbiologie
SIESTRUNCK	T Mécanique physique et Expérimentale
LACOMBE	T Métallurgie (ORSAY)
BROCHARD	T Physique P.C.B. (ORSAY)
CABANNES	T Mécanique générale
LESIEUR	T Mathématiques M.P.C. (ORSAY)
MAZET	T Mécanique générale (ORSAY)

SECRETAIRE GENERAL R. POUILLAIN

A LA MEMOIRE DE MON PERE

qui m'a légué sa passion des Sciences de
la Nature et m'a communiqué, dès mon
plus jeune âge, son goût de l'observa-
tion et de la réflexion.

ETUDE DES PROPRIETES ET DE LA BIOSYNTHESE DE LA

GLUCURONIDASE ET DE LA GLUCURONIDE-PERMEASE

CHEZ ESCHERICHIA COLI

AVANT PROPOS

Ce travail a été réalisé dans le Service de Biochimie cellulaire de l'Institut Pasteur.

Je ne pourrai jamais assez exprimer ma gratitude à M. Jacques MONOD, Professeur à la Sorbonne, Chef de Service à l'Institut Pasteur, qui m'a guidé tout au long de ces recherches. Ses conseils, ses critiques, sa sollicitude de tous les instants ont été pour moi le meilleur des encouragements. Je voudrais qu'il sache que je n'oublierai jamais tout ce que je lui dois. L'atmosphère d'équipe stimulante qu'il a su créer au sein de son laboratoire a beaucoup contribué à la bonne réalisation de mon travail et je ne voudrais pas manquer de remercier vivement ici mes collègues et amis, ainsi que tout le personnel du Service de Biochimie cellulaire, pour l'aide et les conseils précieux qu'ils m'ont dispensés.

A M. Jacques TREFOUEL, membre de l'Institut et de l'Académie Nationale de Médecine, Directeur de l'Institut Pasteur, je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements pour l'accueil bienveillant qu'il m'a réservé à l'Institut Pasteur.

Je garde une profonde reconnaissance à M. Michel MACHEBOEUF, Membre de l'Académie Nationale de Médecine, Professeur à la Sorbonne, Chef de Service à l'Institut Pasteur, qui, le premier, m'accueillit dans son service et dirigea avec une grande bienveillance mes premières recherches.

Je suis très reconnaissant à M. le Professeur B. HELFERICH, Directeur Honoraire de l'Institut de Chimie de l'Université de Bonn (Allemagne), de m'avoir autorisé à effectuer un stage dans son laboratoire. J'ai pu y acquérir de précieuses connaissances dans le domaine de la chimie des glucides ; avec l'aide de son collaborateur, le Dr D. TURK, j'ai synthétisé une grande partie des corps utilisés dans ce travail.

A M. E. LEDERER, Professeur à la Sorbonne, et à M. A. LWOFF, Professeur à la Sorbonne, Chef de Service à l'Institut Pasteur, qui ont bien voulu s'intéresser à mon travail et m'ont fait l'honneur de faire partie du Jury de cette thèse, j'exprime ma respectueuse gratitude. Je remercie particulièrement M. LWOFF qui m'a permis de travailler plusieurs mois dans son service.

M. J. SENEZ, Maître de Recherches, a bien voulu accepter d'être mon parrain au Centre National de la Recherche Scientifique et je n'ai jamais sollicité en vain son aide et ses conseils. Qu'il en soit ici bien sincèrement remercié.

CHAPITRE I

L'EVOLUTION PROGRESSIVE DE NOS CONNAISSANCES

SUR LA BIOSYNTHESE DES ENZYMES

Les problèmes que pose la biogénèse des enzymes ont commencé d'attirer l'attention des biochimistes et des biologistes voici plus d'un demi siècle. L'expérimentation systématique a conduit, depuis ce temps, à une accumulation impressionnante d'observations coordonnées, et, corollaire obligatoire, les hypothèses et les théories en ont jailli nombreuses, se relayant, s'étayant ou s'évinçant mutuellement. Si bien des idées ont maintenant pris rang de certitude dans ce domaine, l'étude approfondie des mécanismes présidant à la biosynthèse des enzymes n'en demeure pas moins l'une des tâches essentielles de la biologie moderne. Non seulement parce que bien des questions concernant ce sujet restent encore sans réponse, mais encore parce que l'évolution même des branches voisines de la biochimie et de la biologie cellulaire n'ont fait qu'accentuer l'intérêt de telles recherches.

Les mécanismes intimes de la biosynthèse des protéines ne nous sont pas encore bien connus. Cependant bien des points en ont déjà pu être éclaircis, en particulier grâce à l'étude des systèmes enzymatiques, qui se sont avérés être des instruments de choix dans ce domaine. En effet, les enzymes sont d'une part facilement dosables grâce à leur activité biologique spécifique ; d'autre part l'existence de substances capables d'activer ("inducteurs") ou d'inhiber ("répresseurs") sélectivement leur formation confère une grande souplesse à l'expérimentation qui en fait usage. Il est maintenant établi que, pour de nombreuses séquences anaboliques, la synthèse des enzymes qui y sont impliqués est contrôlée,

limitée par les produits finaux de l'activité de ces enzymes (phénomène de "répression enzymatique"). Dans d'autres cas, et ceci est valable en particulier dans de nombreuses phases initiales du métabolisme dégradatif, la cellule ne commence à synthétiser les enzymes nécessaires que lorsqu'elle est mise en contact avec des substrats capables d'être attaqués par ces enzymes (phénomène d' "induction enzymatique"). Nous voyons se dessiner ici tout un mécanisme à la fois complexe et précis, baptisé parfois du nom évocateur de "cybernétique enzymatique". Grâce à un jeu subtil de contrôles et de rétroactions, il permet à la cellule de maintenir à tout moment son économie dans les limites étroites compatibles avec sa survie et sa reproduction.

On peut distinguer dans la synthèse des protéines deux étapes. L'une est "non spécifique" et commune à toutes les synthèses protéiques : c'est l'activation des aminoacides précédant leur intégration au sein de la molécule protéique. L'autre, "spécifique", consiste en l'assemblage de ces aminoacides selon une configuration précise, conférant à la molécule protéique engendrée sa spécificité biologique. On connaît actuellement deux types de facteurs agissant sur le processus spécifique de la synthèse protéique et ils ont été analysés avec une attention particulière dans le cas de la biosynthèse des enzymes. Ce sont soit des facteurs chimiques (inducteurs, répresseurs), soit des facteurs génétiques (mutations affectant les gènes contrôlant la synthèse des enzymes).

En ce qui concerne les facteurs chimiques, on a pu mettre en évidence une relation étroite entre la configuration stérique des substances inductrices et celle des corps sur lesquels l'enzyme induit peut réagir. Ceci pose la question du mécanisme d'action de l'inducteur et de son interaction possible avec les facteurs génétiques. Quelle est l'origine des mécanismes déterminant les structures cellulaires spécifiques, en particulier celle des constituants biologiquement actifs et des mécanismes qui assurent la régulation harmonieuse du métabolisme cellulaire ? En d'autres termes, ces "informations" diverses conditionnant la nature et le devenir d'une cellule, sont-elles ou non contenues en totalité dans

la structure spécifique du matériel génétique ; quel est le rôle exact des apports exogènes (par exemple action des substances inductrices) au cours de l'élaboration de la partie active dans la structure protéique induite ? Et comment se fait le transfert de ces informations du gène aux divers systèmes effecteurs de la cellule ? Une analyse fine des modalités d'action de l'inducteur d'une part et de la structure et du fonctionnement intégré des gènes gouvernant la synthèse des enzymes d'autre part, a permis d'éclaircir considérablement toutes ces questions.

°
° °

Avant d'aborder l'étude de la β -glucuronidase et de sa biosynthèse chez Escherichia coli, il nous semble utile de retracer brièvement l'évolution progressive des conceptions relatives à la biosynthèse des enzymes en général.

L'augmentation de l'activité enzymatique induite par les substrats spécifiques de cette activité est un phénomène connu de longue date sous le nom "d'adaptation enzymatique" chez les microorganismes. Dès 1882, WORTMAN avait remarqué que des cultures de "Bacterium termio" ne produisaient des ferments attaquant l'amidon que si ce substrat était incorporé au milieu de croissance. Mais c'est à DUCLAUX que revient le mérite d'avoir ouvert le premier une discussion claire de ces phénomènes en 1899. DUCLAUX constata que, chez Aspergillus, la saccharase n'était sécrétée dans le milieu qu'en présence de saccharose, et que la présure et la caséase n'apparaissaient qu'en présence de lait. WENT en 1901 fit état de résultats similaires concernant la production de protéases par "Monilia sitophila" (Neurospora crassa).

Jusqu'ici toutes ces observations ne permettaient pas de conclure que l'accroissement d'activité enzymatique remarqué in vivo était effectivement dû à une augmentation de la protéine enzymatique. Trois hypothèses en particulier ne pouvaient être exclues : celle d'une perméabilité cellulaire accrue rendant l'enzyme plus accessible au substrat*); celle d'une sélection de mutants préexistants, positifs pour l'enzyme impliqué et dont la croissance était ainsi favorisée par rapport à celle du type sauvage ; ou encore celle d'un accroissement de la quantité ou de l'efficacité de coenzymes ou d'effecteurs variés de l'enzyme considéré. Les travaux classiques de DIENERT, en 1901, sur l'adaptation de la levure au galactose établirent tout d'abord l'étroite spécificité du phénomène (seule la présence de galactose ou de galactosides entraîne l'apparition de la "galactozymase"). Ils permirent aussi d'exclure l'hypothèse de la participation d'un processus de sélection génétique : même les cellules non proliférantes (privées de source d'azote) se montrèrent adaptables au galactose. La portée de cette distinction entre l'effet physiologique et l'effet génétique ne fut cependant bien saisie que plus tard.

Lorsque la nature réelle des enzymes fut reconnue, on se demanda si la formation induite d'un enzyme correspondait à l'apparition de l'apoenzyme protéique ou d'un coenzyme. En 1927, EULER et JANSSON établirent grâce à des expériences de dialyse appropriées, le rôle exclusif de l'apoenzyme dans le processus d'induction enzymatique. Ce résultat fut entièrement confirmé en 1947 par les recherches de SPIEGELMAN et MORGAN qui permirent en outre de mettre pratiquement hors de cause la contribution d'un changement de perméabilité cellulaire.

* Cette idée n'est cependant pas valable dans le cas des enzymes étudiés par DUCLAUX, ceux-ci étant sécrétés dans le milieu extérieur.

Ce fut KARSTRÖM (1937) qui attira d'une façon générale l'attention des chercheurs sur le phénomène - jusqu'ici encore peu connu - de l' "adaptation enzymatique"; il proposa la distinction entre enzymes "constitutifs" (formés spontanément, quelle que soit la composition du milieu de culture) et "adaptatifs" (dont la production dépend de la présence du substrat dans le milieu). Cette classification, commode en son temps, a aujourd'hui perdu quelque peu de son intérêt comme nous le verrons ultérieurement.

L'étape suivante fut franchie en 1936-1937 grâce à STEPHENSON et YUDKIN. Ces chercheurs insistèrent sur le fait que l'adaptation enzymatique d'une population bactérienne en voie de croissance pouvait résulter soit d'une action physiologique d'un substrat inducteur sur l'ensemble des cellules, soit d'une sélection progressive d'individus mutants favorisés par la présence de ce substrat. Leurs expériences (STEPHENSON et YUDKIN 1936 ; STEPHENSON 1937) aboutirent au résultat déjà contenu dans les travaux de DIENERT : la sélection génétique ne jouait aucun rôle. Plus tard cependant, MONOD et AUDUREAU (1946) montrèrent que l'adaptation au lactose d'Escherichia coli "mutabile" était imputable à un processus de sélection doublé d'un phénomène d'induction. Ainsi était clairement établi le fait que la biosynthèse induite des enzymes était sous contrôle génétique, mais que le phénomène d'induction en lui-même pouvait se produire sans changement préalable du génotype.

En 1938, YUDKIN tenta pour la première fois d'expliquer de façon raisonnée et objective le phénomène de l'adaptation enzymatique. Il émit l'hypothèse que l'enzyme inductible se formait à partir d'un précurseur selon une réaction réversible et que l'équilibre était en faveur du second. En présence de substrat il y avait formation d'un complexe enzyme-substrat, et l'équilibre était ainsi déplacé dans le sens de la production de l'enzyme. L'avenir allait anéantir cette "théorie de l'équilibre" (ou "théorie de l'action de masse"). Mais son grand mérite fut cependant de fournir une hypothèse de travail simple et claire aux expérimentateurs de la période moderne, période que nous allons aborder maintenant.

La "formation induite des enzymes" (terme qu'en accord avec les définitions modernes - voir MONOD et COHN 1952 et COHN, MONOD, POLLOCK, SPIEGELMAN et STANIER 1953 - il faut préférer à celui d' "adaptation enzymatique" prêtant à confusion) a fait l'objet d'études nombreuses et souvent minutieuses au cours de ces dix ou douze dernières années, sur le plan biochimique, physiologique et génétique. La majeure partie de nos connaissances dans ces domaines fut acquise à la suite des travaux remarquables de MONOD, COHN et leurs collaborateurs sur la β -galactosidase d'*Escherichia coli* (voir COHN 1957 et MONOD 1958^a) et ceux de POLLOCK et son équipe sur la pénicilline de *Bacillus cereus* (voir POLLOCK 1959).

Le schéma de YUDKIN cité plus haut impliquait obligatoirement trois hypothèses : primo l'enzyme induit est synthétisé à partir d'un précurseur préexistant à l'addition de l'inducteur sous la forme d'une molécule protéique ("proenzyme") ; la théorie contraire était que l'induction enzymatique consistait en une synthèse réelle de la molécule protéique à partir de ses constituants élémentaires (aminoacides). Secundo la formation induite de l'enzyme est un phénomène réversible. Tertio la formation d'un complexe spécifique enzyme-substrat déclenchant le processus de l'induction, c'est-à-dire la faculté inductrice d'une substance, est liée à son affinité pour l'enzyme.

Au premier et très important problème soulevé par la théorie de YUDKIN, celui de la nature du précurseur , quatre types d'expériences vinrent apporter une réponse.

En premier lieu, COHN et TORRIANI (1951, 1952, 1953) établirent que l'antigène correspondant à la β -galactosidase est inexistant chez les cellules non induites d'*E. coli*, et qu'au cours du processus de l'induction, il s'accumule graduellement, proportionnellement à l'accroissement d'activité enzymatique observé. Ceci prouvait que l'induction enzymatique correspondait effectivement à l'apparition d'une structure protéique nouvelle par sa spécificité antigénique et excluait pratiquement l'hypothèse d'une simple activation de l'enzyme au cours de l'induction.

Des résultats comparables furent obtenus avec la pénicillinase de B. cereus (POLLOCK 1956).

En 1952, MONOD, PAPPENHEIMER et COHEN-BAZIRE prouvaient que la synthèse induite de la galactosidase exige la participation individuelle de chacun des acides aminés indispensables à la formation des protéines.

Mais la démonstration la plus convaincante sur la nature du processus d'induction fut donnée par d'élégantes expériences de marquage différentiel des constituants cellulaires (soit par ^{35}S soit par ^{14}C), destinées à mettre en évidence l'origine de certains éléments incorporés dans les enzymes induits. HOGNESS, COHN et MONOD (MONOD et COHN 1953 ; HOGNESS, COHN et MONOD 1955) montrèrent que le soufre contenu dans la galactosidase d'E. coli a été incorporé après le déclenchement de l'induction et que les protéines cellulaires préexistantes ne contribuent pas à la synthèse de l'enzyme induit. Les mêmes résultats furent obtenus par ROTMAN et SPIEGELMAN (1954) avec la galactosidase d'E. coli et par POLLOCK et KRAMER (1958) avec la pénicillinase de B. cereus. La preuve est donc faite que l'induction enzymatique procède, non par conversion d'un proenzyme préexistant, mais bien par une synthèse totale d'une protéine nouvelle non seulement par sa configuration, mais par l'origine de ses éléments. Ces expériences ont de plus montré, dans le cas de la galactosidase (HOGNESS et coll. 1955), que l'enzyme formé est stable, que sa synthèse est un phénomène irréversible (pas d'échange de ^{35}S entre les protéines cellulaires et la galactosidase induite). Ainsi s'effondrent les deux premières hypothèses soutenant la théorie de YUDKIN.

Ces résultats sont enfin corroborés par le fait que certains analogues d'acides aminés, comme la β -2-thiénylalanine et l'azatryptophane, sans empêcher la synthèse des protéines en général, inactivent certains enzymes induits dans lesquels ils sont incorporés (MUNIER et COHEN 1956 et 1959 ; COHEN et MUNIER 1959 ; PARDEE et PRESTIDGE 1958). Il est difficile d'expliquer ce phénomène dans le cas où la formation induite

des enzymes ne constitue pas une synthèse de novo.

La troisième hypothèse impliquée dans le schéma de YUDKIN, celle de la formation d'un complexe enzyme-substrat dans le processus de l'induction posait la question du mode d'action de l'inducteur, celui de ses relations de configuration avec l'enzyme induit. L'exploration rationnelle et quantitative de ce problème ne devint possible que grâce à l'élaboration d'une méthodologie rigoureuse basée sur deux conceptions fondamentales : la notion de taux différentiel de synthèse (MONOD, PAPPENHEIMER et COHEN-BAZIRE, 1952) et la notion de gratuité dans l'induction (MONOD et COHN 1952). Le taux différentiel de synthèse, $\frac{dE}{dx}$, est le rapport entre l'accroissement de la quantité d'enzyme dE pendant l'intervalle de temps dt à l'accroissement de la quantité totale de protéines dx dans le même temps. L'utilisation de cette variable permet de différencier les effets spécifiques d'un agent quelconque sur le processus d'induction de ceux qui agissent au niveau de la synthèse protéique en général. Mais d'autres effets non spécifiques doivent également être évités pour permettre une interprétation sans ambiguïté des informations expérimentales. Lorsqu'un inducteur se trouve être en même temps la seule source d'énergie utilisable par la cellule grâce à l'enzyme qu'il induit, les effets primaires et spécifiques de l'inducteur sur la synthèse de l'enzyme ont toutes les chances d'être masqués par des phénomènes secondaires au niveau du métabolisme général, puisque c'est l'enzyme lui-même qui contrôle la quantité d'énergie disponible pour la cellule. Ce ne fut que grâce à l'emploi d'inducteurs non métabolisés ni transformés de quelque façon que ce soit par la cellule (condition de "gratuité" dans l'induction) que la question du mode d'action de l'inducteur pût être abordée valablement sur le plan expérimental (emploi des α -galactosides (MONOD, COHEN-BAZIRE et COHN 1951) et surtout des thiogalactosides (MONOD 1955 ; BUTTIN 1955 ; MONOD 1956) pour la β -galactosidase d'E. coli ; de l' α -Méthyl-glucoside pour l' α -glucosidase de Saccharomyces cerevisiae, par SPIEGELMAN et HALVORSON (1954) ; de la céphalosporine C par POLLOCK (1957) pour la pénicillinase de B. cereus ; des thioglucuronides pour la β -glucuronidase

d'E. coli par STOEGER (1957^a) ; des thioglucosides pour la β -glucosidase de Rhodotorula minuta par DUERKSEN et HALVORSON (1958 ; 1959)).

Pour en revenir au mode d'action de l'inducteur, les hypothèses faites à ce sujet avaient toutes pour point de départ l'étroite relation de spécificité constatée entre la configuration de l'inducteur et celle des corps sur lesquels l'enzyme induit était actif. On peut les classer en trois catégories (MONOD, COHEN-BAZIRE et COHN 1951) :

I - Hypothèses "fonctionnelles" (DUBOS 1940, HINSHELWOOD 1946) : la formation de l'enzyme dépend de son activité métabolique.

II - Hypothèses "du complexe" (YUDKIN 1938 ; SPIEGELMAN 1946 ; MONOD 1947 ; MONOD 1949^a) : la synthèse de l'enzyme résulte de la formation d'un complexe stéréospécifique enzyme-inducteur qui déplace l'équilibre Pré-curseur $\rightleftharpoons$ Enzyme dans le sens de la production de ce dernier.

III - Hypothèses "catalytiques" (MONOD 1943 ; MONOD 1945 ; MONOD 1955 ; EMERSON 1945 ; POLLOCK 1950 ; COHN et MONOD 1953) : l'inducteur agit en se combinant avec un centre formateur de l'enzyme et en activant ce centre.

Une étude approfondie de la spécificité de l'induction de la β -galactosidase chez E. coli a permis d'opérer un choix entre ces trois sortes d'hypothèses, en dissociant clairement les trois fonctions de substrat, de complexant et d'inducteur de cet enzyme (MONOD, COHEN-BAZIRE et COHN 1951 ; MONOD 1955, MONOD 1958^a). Il existe en effet :

1°) des substrats de la galactosidase incapables d'induire sa synthèse, ce qui élimine les hypothèses de type I ;

2°) des analogues de galactosides non substrats, mais qui, tout en manifestant une forte affinité pour l'enzyme, ne sont pas inducteurs , ce qui est contraire aux hypothèses de type II ;

3°) des inducteurs non substrats et dépourvus d'affinité pour la galactosidase, ce qui va à la fois à l'encontre des hypothèses de type I et II.

Ces résultats ont été partiellement retrouvés pour la pénicillinase de B. cereus (POLLOCK 1957), pour la glucuronidase d'E. coli (STOEBER 1957^a) ainsi que nous le verrons au chapitre VI, et enfin pour la β -glucosidase de levure (DUERKSEN et HALVORSON, 1958 et 1959). Il reste néanmoins solidement établi que le pouvoir inducteur d'une substance vis-à-vis d'un enzyme donné est lié à une configuration stérique en relation de spécificité étroite avec celle de l'enzyme. Le seul genre d'hypothèse qui demeure valable est par conséquent celui d'une action catalytique de l'inducteur.

Deux groupes d'expériences viennent renforcer cette conclusion. En premier lieu, POLLOCK et ses collaborateurs ont montré que dans le cas de la pénicillinase de B. cereus il y a effectivement 20 à 40 fois plus de molécules d'enzyme synthétisées que de molécules d'inducteur fixées (POLLOCK 1953 ; POLLOCK et TORRIANI 1953 ; POLLOCK, TORRIANI et TRIDGELL 1956 ; KOGUT, POLLOCK et TRIDGELL 1956 ; POLLOCK et PERRET 1951) ; ceci prouve directement que l'inducteur n'est pas utilisé stoechiométriquement dans le processus de l'induction, mais qu'il joue un rôle de catalyseur. D'autre part, l'allure linéaire de la cinétique de la biosynthèse induite de divers enzymes (taux différentiel de synthèse constant) suggère également une action catalytique de l'inducteur, ainsi que nous le verrons dans le chapitre VI (p.182).

Ceux qui étudiaient le mécanisme intime du processus d'induction enzymatique ont été conduits à se demander s'il y avait ou non transfert d'information de l'inducteur au système formateur d'enzyme. En d'autres termes la structure spécifique de l'enzyme induit, complémentaire de celle de son substrat, tire-t-elle son origine de la configuration, elle aussi spécifique, de l'inducteur ou bien préexiste-t-elle dans la cellule sous forme d'une information purement génique ? Or la galactosidase induite par des inducteurs offrant des affinités très différentes pour l'enzyme (de même que la galactosidase synthétisée en l'absence d'inducteur par les souches "constitutives") présente dans tous les cas les mêmes constantes d'affinité pour divers substrats ou inhibiteurs compétitifs (MONOD

et COHN 1952). Ceci permet de penser que la structure de l'enzyme induit n'est pas influencée par la nature de l'inducteur. Il existe d'autre part des analogues de galactosides capables d'inhiber compétitivement et spécifiquement l'action des galactosides inducteurs. Ce fait suggère l'existence de récepteurs spécifiques des inducteurs dans la cellule, préexistant à l'action de ces inducteurs (MONOD 1955 et 1956).

Pour demeurer fidèle, non certes à un ordre logique, mais à un ordre chronologique, il nous faut à présent mentionner la découverte, à partir de 1954, d'un phénomène qui joue un grand rôle dans les processus d'induction et offrit la clef de bien des énigmes constatées à leur égard. De 1954 à 1955, COHEN, MONOD et leurs collaborateurs mirent en évidence chez E. coli un système capable d'accumuler réversiblement les galactosides à l'intérieur des cellules à une concentration de loin supérieure à celle du milieu extérieur (COHEN et RICKENBERG 1955^a; RICKENBERG, COHEN, BUTTIN et MONOD 1956). Cette accumulation est étroitement stéréospécifique (limitée aux galactosides et à leurs proches analogues stériques), liée à la synthèse des protéines et inductible; elle obéit d'autre part à une loi cinétique analogue à celle qui régit l'activité des enzymes (loi de HENRI-MICHAELIS). C'est pourquoi les auteurs proposèrent le nom de galactoside-perméase pour ce système. Nous aurons l'occasion de revenir plus en détail sur ces systèmes (notamment dans le chapitre V). Qu'il nous suffise pour l'instant de dire que, dans les années qui suivirent, l'existence de nombreuses perméases fut révélée, dont beaucoup intervenaient dans la biosynthèse induite des enzymes (voir COHEN et MONOD 1957). Comme nous le verrons plus loin, la synthèse de la glucuronidase chez E. coli ne fait pas exception à cette règle. La présence de ces perméases explique de nombreuses observations jusqu'ici demeurées incompréhensibles; ainsi par exemple l'effet de "préinduction", c'est-à-dire le fait que des cellules préalablement induites deviennent plus sensibles à une faible concentration d'inducteur; ou encore l'existence de souches d'E. coli dites "cryptiques", incapables de croître sur lactose bien que formant de grandes quantités de galactosidase. Nous reparlerons ultérieurement de ces phénomènes (chapitre VI).

Nous allons aborder maintenant une phase de l'étude des bio-synthèses enzymatiques induites que l'on peut considérer comme l'une des plus "actuelles" : celle de l'analyse du contrôle génétique de ces biosynthèses induites. Il y a plusieurs années déjà les travaux de PENROSE, d'EPHRUSSI, de BEADLE et coll. (voir BEADLE 1945) ont conduit à l'hypothèse que la synthèse de chaque enzyme est gouvernée par un gène spécifique. On sait d'autre part que les théories modernes assignent aux gènes le rôle de déterminer la séquence des acides aminés d'une protéine donnée (voir ANFINSEN 1959). Or l'analyse génétique fine du système perméase-galactosidase chez E. coli a mis en évidence l'existence de deux types de gènes gouvernant la biosynthèse de ce système : des "gènes de structure" et des "gènes régulateurs" (JACOB et MONOD 1959 ; MONOD 1959 ; JACOB et MONOD 1961). Mais avant d'exposer ces résultats qui éclairent sous un jour tout nouveau nos conceptions sur le mécanisme de l'induction, il convient de revenir quelque peu sur le phénomène de la "répression enzymatique" dont il a déjà été question au début de ce chapitre. Ainsi que nous l'avons vu, il s'agit du fait que la biosynthèse de nombreux enzymes dits "constitutifs" est inhibée spécifiquement par les produits de leur action. Les premières observations à ce sujet datent de 1953 ; elles concernent la répression de la synthèse de la tryptophane-synthétase par le tryptophane chez Aerobacter aerogenes (MONOD et COHEN-BAZIRE 1953^b) et la répression par la méthionine de la formation du système enzymatique responsable de la synthèse de cet aminoacide chez E. coli (COHN, COHEN, et MONOD 1953 ; WIEJESUNDERA et WOODS 1953). Plusieurs systèmes analogues furent alors étudiés en détail : VOGEL (1957^a) d'une part, et GORINI et MAAS (1957) d'autre part, établirent que la synthèse des divers enzymes responsables de la séquence anabolique aboutissant à l'arginine était inhibée par l'arginine. YATES et PARDEE (1957) démontrèrent des effets analogues dans la biosynthèse des noyaux pyrimidiques et MAGASANIK (1958) les mit également en évidence dans le cas de l'anabolisme des dérivés puriques. Enfin, ces dernières années, plusieurs exemples similaires ont été rapportés dans divers systèmes (voir PARDEE 1959 et MAGASANIK, MAGASANIK et NEIDHARDT 1959).

Ainsi qu'on peut le constater, une symétrie remarquable se dégage des observations concernant l' "induction" et la "répression". Opposées dans leurs effets (activation dans un cas, et inhibition dans l'autre, de la biosynthèse des enzymes), mais exerçant toutes deux un contrôle spécifique sur la génèse des enzymes, les deux processus semblent relever d'un même mécanisme fondamental qui peut faire l'objet de deux hypothèses inverses (PARDEE, JACOB et MONOD 1958 et 1959):

1°) Le mécanisme primaire consiste en une induction , le répresseur agit comme un antagoniste de l'inducteur externe (enzymes inductibles) ou interne (enzymes constitutifs) (COHN et MONOD 1953).

2°) La synthèse de tout enzyme est, fondamentalement, réprimée . Dans le cas des enzymes inductibles c'est l'inducteur qui exerce une action antagoniste du répresseur (NEIDHARDT et MAGASANIK 1956^a, 1956^b, 1957 ; MAGASANIK, NEIDHARDT et LEVIN 1958 ; VOGEL 1957^b ; PARDEE, JACOB et MONOD 1958, 1959 ; HOGNESS 1959).

Or les résultats de l'analyse génétique et biochimique du système synthétisant la galactosidase chez E. coli (PARDEE, JACOB , MONOD, 1958 et 1959 ; MONOD 1959 ; JACOB et MONOD 1961) suggèrent fortement l'existence de deux sortes de gènes : d'une part un gène "informateur", contenant toute l'information nécessaire à l'élaboration de la structure protéique responsable de l'activité galactosidasique ; d'autre part un gène "régulateur" indépendant, déterminant la synthèse d'une substance ("répresseur") inhibant spécifiquement l'expression du "gène informateur". Les inducteurs doivent alors être considérés comme des antagonistes spécifiques de ce "répresseur". C'est donc, selon toute vraisemblance, la deuxième hypothèse envisagée ci-dessus qui se trouve vérifiée. Des recherches toutes récentes (JACOB, PERRIN, SANCHEZ et MONOD 1960 ; JACOB et MONOD 1961) semblent même suggérer que le "gène informateur" relatif à la galactoside-perméase, le "gène informateur" correspondant à la galactosidase et leur "gène régulateur" commun constituent une étroite association fonctionnelle sur le plan génétique, contrôlée par un gène

coordinateur à effet pléiotrope ("opérateur"). L'ensemble constitue une unité génétique fonctionnelle que l'on a proposé d'appeler "opéron". Des résultats tout à fait analogues, en ce qui concerne le gène de structure et le gène régulateur ont été retrouvés avec le système responsable de la synthèse du tryptophane chez E. coli (COHEN et JACOB 1959^a), ainsi que dans d'autres séquences métaboliques concernant en particulier la méthionine (COHEN et JACOB 1959^b) et l'arginine (voir JACOB et MONOD 1961) et enfin avec la phosphatase alcaline (voir JACOB et MONOD 1961).

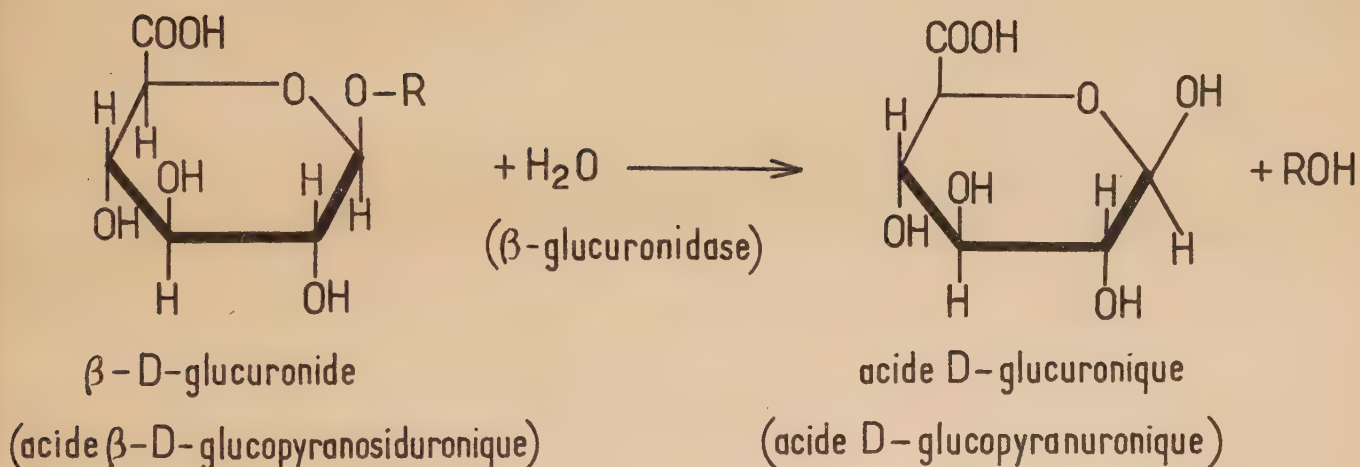
La question de la nature chimique du répresseur et de son mode d'action n'en est encore qu'à ses débuts, car elle s'avère d'un abord très difficile sur le plan technique. Les expériences de PARDEE et PRESTIDGE (1959) montrent toutefois qu'il ne s'agit pas d'une protéine. D'autre part, les nombreux cas de suppression de synthèse d'enzymes observés en présence de glucides variés et surtout de glucose (voir entre autres : DIENERT 1900 ; MONOD 1942 ; GALE 1943 ; COHN et HORIBATA 1959) ont été interprétés comme un effet de répression non spécifique, le glucose agissant en tant que source métabolique préférentielle pour le répresseur endogène (NEIDHARDT et MAGASANIK 1956^b ; NEIDHARDT et MAGASANIK 1957 ; MAGASANIK 1957 ; MAGASANIK, MAGASANIK et NEIDHARDT 1959 ; COHN et HORIBATA 1959^b).

Ainsi qu'on peut le constater, de nombreux problèmes posés par l'induction enzymatique ont déjà reçu une solution. Cependant, bien des énigmes demeurent; par ailleurs beaucoup des résultats obtenus ne concernaient jusqu'ici qu'un ou deux systèmes enzymatiques, généralement la galactosidase d'E. coli ou la pénicillinase de B. cereus. Il était donc souhaitable d'élargir le champ des investigations en analysant d'autres cas de biosynthèses enzymatiques induites. Nous nous proposons de montrer ici en quoi l'étude de la β -glucuronidase et de sa synthèse chez E. coli a servi ce but et permis de généraliser bien des conclusions reposant jusqu'ici souvent sur des observations isolées.

CHAPITRE II

INTRODUCTION A L'ETUDE DE LA β -GLUCURONIDASE D'ESCHERICHIA COLI

La β -glucuronidase est l'enzyme catalysant de manière spécifique la coupure hydrolytique des β -D-glucuronides (dérivés β -osidiques de l'acide D-glucuronique) :



(R = radical organique quelconque, par exemple CH_3)

Depuis une quinzaine d'années environ, cet enzyme a fait l'objet de nombreuses études, tant sur le plan de sa distribution chez les divers êtres vivants, que celui de ses propriétés biochimiques et de son rôle

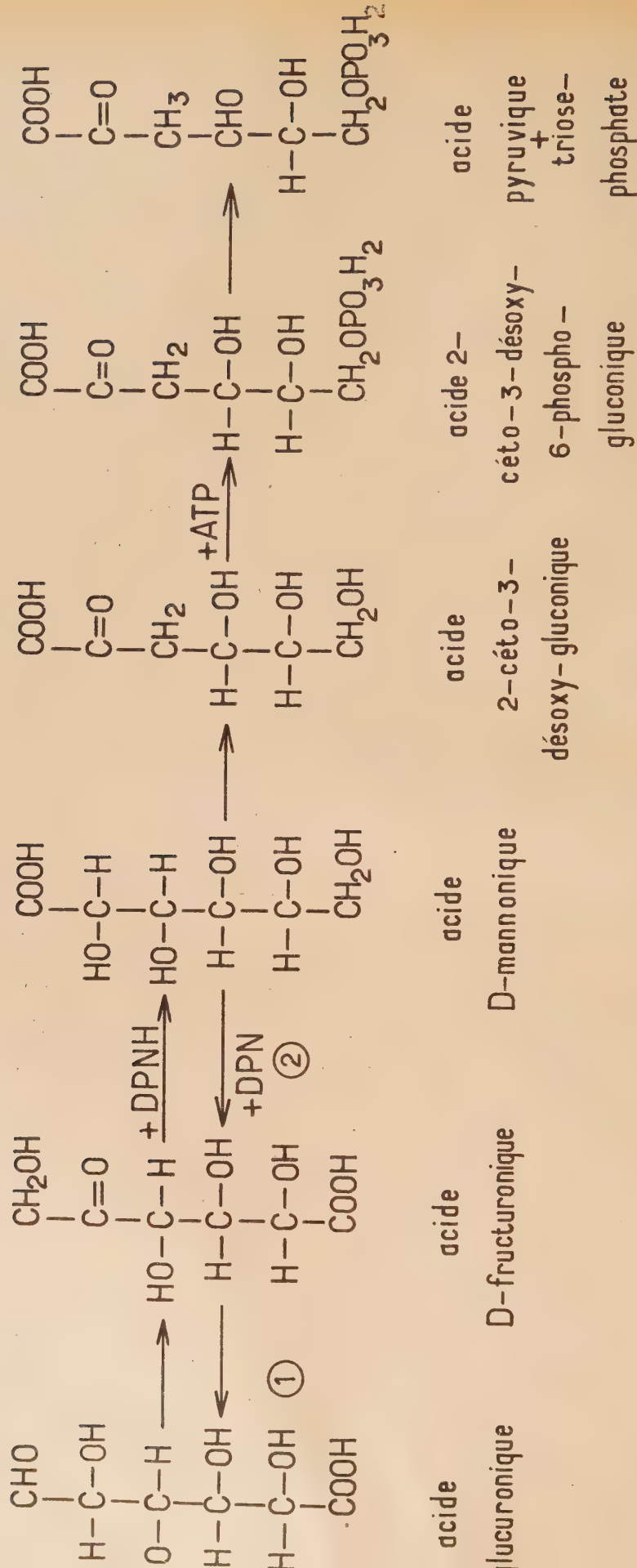
physiologique (voir à ce sujet les revues de W.H. FISHMAN 1950 et 1955 et celles plus récentes, de LEVY et MARSH 1959 et 1960). Universellement répandue à travers le règne animal, la glucuronidase a été décelée dans les tissus et organes (foie, rate, rein, appareil génital, sang, etc..) de nombreux mammifères, tels que le rat, la souris, le boeuf, le lapin, le chien, l'homme. On la rencontre également chez certains poissons ou batraciens et chez des invertébrés comme les insectes (sauterelles) et les mollusques (*Helix*, *Littorina*, *Patella*). On trouve même une glucuronidase chez les plantes (par exemple, *Scutellaria baicalensis*). La purification et les propriétés de cet enzyme provenant des divers organismes cités ont fait l'objet d'études assez détaillées (voir LEVY et MARSH 1959 et 1960) ; de nombreux auteurs ont également cherché à analyser son rôle physiologique (en particulier son rapport avec l'activité des hormones oestrogènes, androgènes et corticostéroïdes, avec la prolifération des tissus, son activité de transférase, etc ..) . Cet enzyme s'est en outre avéré être un instrument précieux pour la caractérisation chimique des glucuronides produits dans l'organisme par le métabolisme de détoxification ("glucuronoconjugués") et pour l'étude du métabolisme des stéroïdes.

La β -glucuronidase est également assez largement répandue chez les microorganismes, et en particulier les bactéries, mais elle y a été étudiée de manière souvent moins approfondie que chez les autres êtres vivants. En particulier son mode de biosynthèse n'a pratiquement pas été analysé avec précision jusqu'ici. Elle a été mise en évidence chez *Escherichia coli* par BUEHLER, KATZMAN et DOISY (1949, 1951), puis par SMITH et MILLS (1950). Ces auteurs, de même que BEALL et GRANT (1952) et DOYLE et coll. (1952, 1954, 1955) ont montré que la présence de β -glucuronides (menthyl- et bornylglucuronides) dans le milieu de culture favorisait la production de glucuronidase, voire même qu'elle était indispensable pour certaines souches. Ils ont partiellement purifié l'enzyme et étudié certaines de ses propriétés biochimiques (BUEHLER et coll. 1949, 1951 ; SMITH et MILLS 1950 ; DOYLE et coll. 1952, 1954, 1955).

Une activité β -glucuronidasique a également été trouvée chez Staphylococcus (BARBER, BROOKSBANK et KUPER 1951), chez Streptococcus (ROBINSON, BLINN et FRANK 1952 ; JACOX et CUSHING 1953 ; WILLIAMS 1954), chez Corynebacterium (BUEHLER, KATZMAN et DOISY 1949^a) et chez diverses bactéries parasites du vagin humain (GREEN, BURT, HESSELTINE et ODELL 1951) et du rumen de mouton (KARUNAIRATNAM et LEVY 1951 ; MARSH 1954 ; MARSH 1955).

Il nous semble utile de rappeler à présent le contexte métabolique dans lequel se situe l'activité de la glucuronidase, c'est-à-dire de retracer brièvement les diverses étapes du métabolisme de l'acide D-glucuronique, produit de l'activité glucuronidasique. Nous passerons rapidement sur le cycle de l'acide glucuronique chez les organismes supérieurs (animaux) (voir à ce sujet HORECKER, 1958 et HOLZER, 1959) qui diffère nettement de la voie métabolique empruntée par les microorganismes. Chez les mammifères, l'acide glucuronique est d'abord réduit en acide L-gulonique ; il y a ensuite réoxydation en un intermédiaire hypothétique, l'acide 3-cétogulonique, puis, soit passage à l'acide L-ascorbique (énolisation et lactonisation) soit décarboxylation en L-xylulose. Par réduction de ce dernier, on obtient le xylitol, puis par réoxydation le D-xylulose ; celui-ci enfin, phosphorylé en D-xylulose-5-phosphate, entre dans le cycle habituel des pentoses.

Il en va tout autrement chez les microorganismes. Ainsi chez Escherichia coli, WAHBA et coll. (1958), ASHWELL et coll. (1958) et CYNKIN et coll. (1959) ont montré récemment l'existence des étapes suivantes de dégradation de l'acide glucuronique :



① = glucuronate isomérase

② = fructuronate réductase

C'est au moyen de ces deux derniers corps en C_3 que le catabolisme de l'acide glucuronique se raccorde au cycle glycolytique classique.

Toutes ces étapes sont catalysées par des enzymes spécifiques partiellement purifiés (WAHBA et coll. 1958 ; ASHWELL et coll. 1959 ; CYNKIN et coll. 1959 ; TAKAGI et coll. 1959). Les mêmes séquences métaboliques ont été décelées également chez Erwinia carotovora (KILGORE et STARR 1959^b), où les enzymes catalysant les deux premières réactions sont au moins partiellement inductibles. La même étape préliminaire d'isomérisation de l'acide glucuronique en acide D-fructuronique a été mise en évidence chez Serratia marcescens (PAYNE et McRORIE 1958 ; McRORIE, WILLIAMS et PAYNE 1959), Aerobacter aerogenes (McRORIE et NIVELLI 1958 ; McRORIE, WILLIAMS et PAYNE 1959) et Shigella flexneri (McRORIE, WILLIAMS et PAYNE 1959) et ici encore les isomérases sont inductibles. Il semble que chez ces trois organismes le produit de la réduction enzymatique de l'acide D-fructuronique soit l'acide L-gulonique. Chez A. aerogenes on a d'autre part montré que l'acide D-fructuronique pouvait également être phosphorylé en 1, puis scindé en dihydroxyacétone-phosphate et en semialdéhyde tartronique, transformés tous deux ultérieurement en pyruvate. Enfin chez un Pseudomonas phytopathogène (P. syringae) la dégradation de l'acide glucuronique se fait encore différemment : ce dernier est selon toute vraisemblance transformé en acide glucarique par une "uronico-déshydrogénase" (KILGORE et STARR 1959^a ; KILGORE, RUSH et STARR 1959) ; chez Agrobacterium tumefaciens, qui tout comme P. syringae ne contient pas trace d'activité isomérasique ni céto-réductasique, une "uronico-déshydrogénase" a également été mise en évidence (ZAJIC 1959).

Nous allons maintenant exposer brièvement les raisons qui ont commandé le choix de la β -glucuronidase d'E. coli comme objet du présent travail.

En premier lieu, il s'agit ici de la biosynthèse d'un enzyme de caractère nettement inductible, pratiquement absent chez les souches non induites, mais produit en très grande quantité par les populations cellulaires dès qu'on ajoute un glucuronide à leur milieu de culture ; ceci

offre à l'expérimentation une grande latitude de manoeuvre. De plus, élément essentiel lorsqu'on doit effectuer un grand nombre de dosages enzymatiques, l'activité glucuronidasique se mesure facilement et rapidement, grâce à l'emploi d'un substrat chromogène le phénolphtaléine - β -D-glucuronide ; la phénolphtaléine libérée à partir de ce dernier par l'enzyme est dosable colorimétriquement avec grande précision. L'hydrolyse des glucuronides constitue d'autre part une réaction métabolique "initiale", elle est le point de départ d'une séquence dégradative, ce qui rend plus aisé son étude isolée. Un autre intérêt de ce choix réside encore dans le fait que la réaction catalysée par la glucuronidase chez E. coli est suivie de toute une séquence métabolique déjà assez bien connue sur le plan biochimique et dont les enzymes semblent en grande partie inductibles. Ceci offre la perspective d'intéressantes études ultérieures portant d'une part sur la physiologie de l'induction séquentielle de ces divers enzymes et leur interaction fonctionnelle et d'autre part sur le contrôle et la coordination génétique des biosynthèses de ces enzymes.

Enfin, le choix d'E. coli comme organisme d'expérimentation a été dicté par le fait que la culture de cette bactérie est facile et rapide, sa physiologie bien connue, les éléments de base de sa génétique également bien établis ; il est, en outre, facile de modifier expérimentalement son génome (croisements, transductions, sexduction).

Nous terminerons ce chapitre en énumérant les diverses étapes que comporte cette étude.

Nous décrirons tout d'abord les synthèses chimiques de glucuronides de structure variée que nous avons mises au point, en vue de l'étude des phénomènes d'induction de la glucuronidase (chapitre III). Nous analyserons ensuite les propriétés biochimiques de l'enzyme in vitro, d'une part sur des extraits cellulaires bruts, d'autre part sur l'enzyme purifié, après avoir préalablement exposé les méthodes de purification employées (chapitre IV). Puis nous aborderons la question du "métabolisme préalable" de l'inducteur, c'est-à-dire en fait de son mode de pénétration dans la cellule bactérienne (caractérisation et propriétés de la "glucuronide-

perméase", Chapitre V). Nous étudierons enfin la biosynthèse de la glucu-
ronidase chez E. Coli sur le plan physiologique et exposerons en parti-
culier les résultats de l'analyse cinétique du processus d'induction
(chapitre VI).

•
• •

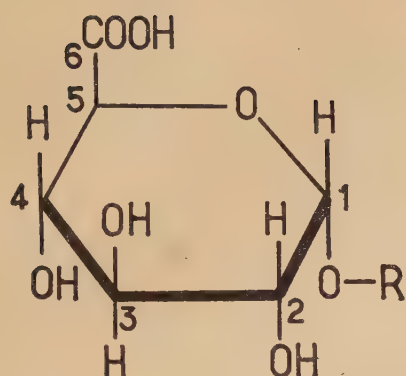
CHAPITRE III

PREPARATION DE DIVERS GLUCURONIDES NECESSAIRES A L'ETUDE DU SYSTEME PERMEASE & GLUCURONIDASE D'ESCHERICHIA COLI

Parmi les buts que nous nous étions fixés dans ce travail figurait, entre autres, l'analyse précise de la spécificité d'induction et de fonctionnement de la glucuronide-perméase. Nous désirions, d'autre part, étudier la relation qui existe entre la structure de l'aglycone des glucuronides et le pouvoir inducteur de ceux-ci vis-à-vis de la glucuronidase d'E. coli. Nous nous proposons également de déterminer les affinités de cet enzyme pour divers substrats ou inhibiteurs compétitifs. Il était donc intéressant de pouvoir disposer d'un grand nombre de glucuronides de structure variée.

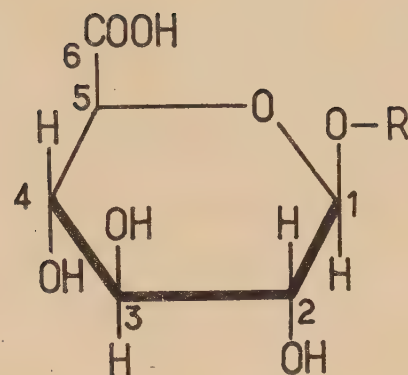
Ainsi que nous l'avons vu au chapitre I, l'emploi de thiogalactosides comme inducteurs "gratuits" (non hydrolysables ni métabolisables par la cellule bactérienne) s'est avéré du plus grand intérêt dans l'étude de la synthèse induite de la galactosidase. Escomptant une situation analogue dans notre système, nous avons cherché à synthétiser, en plus des "glucuronides vrais", leurs analogues soufrés, les "thioglucuronides".

Rappelons que les D-glucuronides sont les dérivés héli-acétaliques de l'acide D-glucuronique (acides D-glucopyranosiduroniques) ; ils résultent de la condensation d'un alcool avec la fonction pseudoaldéhyde en 1 de l'acide glucuronique. Ces corps peuvent revêtir la forme α ou β :



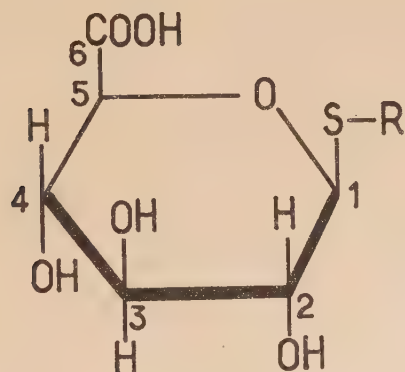
α -D-glucuronide

R = radical
organique
quelconque



β -D-glucuronide

Si l'on remplace l'oxygène de la liaison osidique en 1 par un atome de soufre on obtient un thioglucuronide, ainsi par exemple :



β -D-thioglucuronide

Tous les glucuronides que nous avons préparés appartenaient à la série D et possédaient la configuration β .

Nous allons indiquer maintenant le mode opératoire pour la synthèse des différents "thioglucuronides" * et des "glucuronides vrais" que nous avons préparés en tant que corps nouveaux pour ce travail.

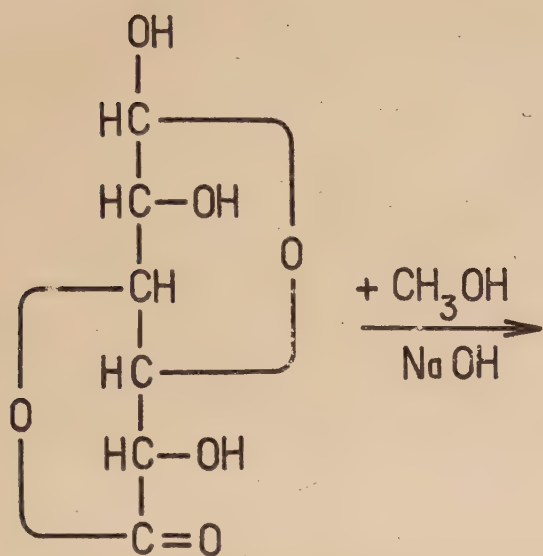
1. SYNTHESE DE THIOGLUCURONIDES

La méthode que nous avons adoptée consistait à condenser l'ester méthylique de l'acide 1-bromo-2, 3, 4-triacétylglucuronique avec le sel de potassium du mercaptan de configuration voulue en solution dans le méthanol. Comme le mercapture de potassium, par sa réaction alcaline, provoque une désacétylation partielle, on obtient un mélange de triacétylthioglucuronide et de dérivés partiellement désacétylés. Une réacétylation du produit brut de la réaction par le mélange pyridine-anhydride acétique permet d'obtenir le dérivé triacétylé avec un bon rendement et de le purifier. Ce dernier est ensuite désacétylé catalytiquement par l'action du méthylate de sodium et donne naissance à l'ester méthylique du thioglucuronide. En saponifiant par la baryte aqueuse on obtient le thioglucuronide sous forme acide libre. Le bromotriacétylglucuronate de méthyle était obtenu selon une méthode dérivée de celle de BOLLENBACK et coll. (1955) : on préparait du glucuronate de méthyle en faisant agir du méthanol sur la glucuronolactone en présence de soude ; puis on acétylait le glucuronate de méthyle en 1, 2, 3, 4 par l'anhydride acétique en solution dans la pyridine. Le 1, 2, 3, 4-tétraacétylglucuronate de méthyle obtenu était

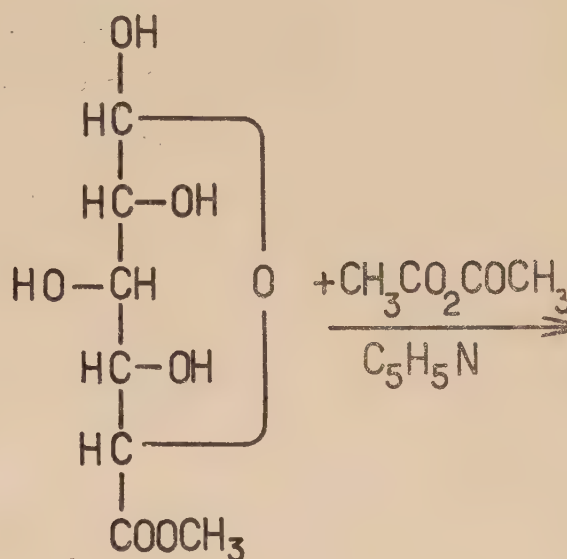
* Les thioglucuronides ont été synthétisés en collaboration avec le Dr. D. TÜRK, élève du Professeur B. HELFERICH de Bonn (Allemagne). Ce travail a déjà fait l'objet d'une publication antérieure (HELFERICH, TÜRK et STOEGER, 1956).

ensuite transformé en 1-bromo-2,3,4-triacétylglucuronate de méthyle par action de l'acide acétique saturé d'acide bromhydrique.

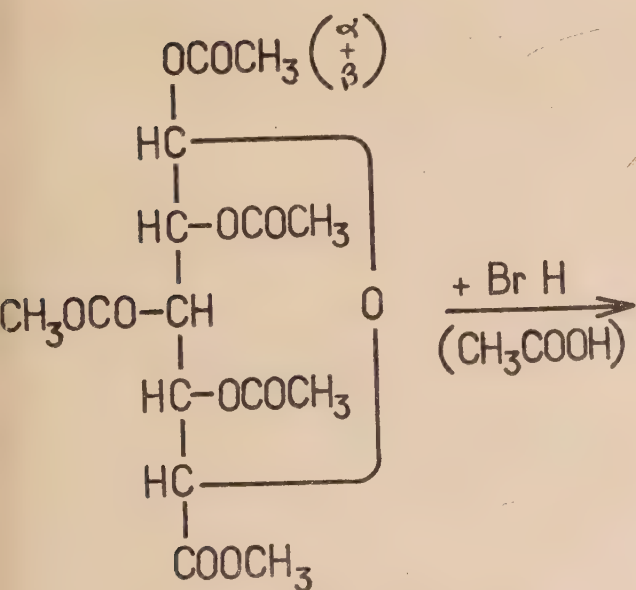
Voici les réactions chimiques correspondant à ces différentes étapes



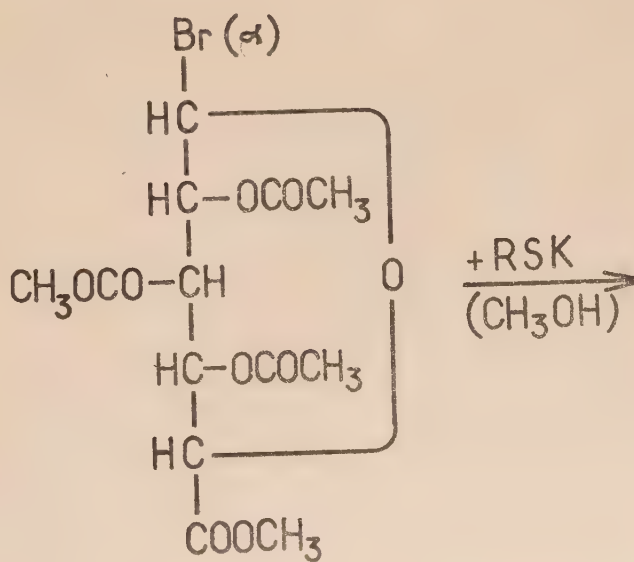
Glucurono lactone



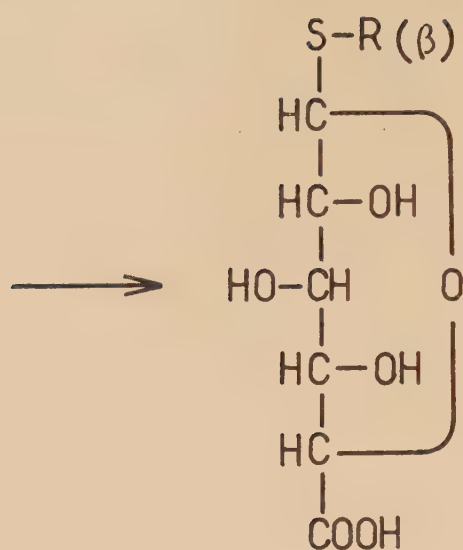
Glucuronate de méthyle



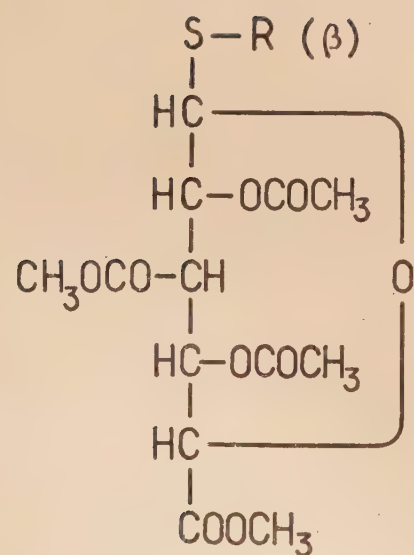
Tétraacétylglucuronate de méthyle



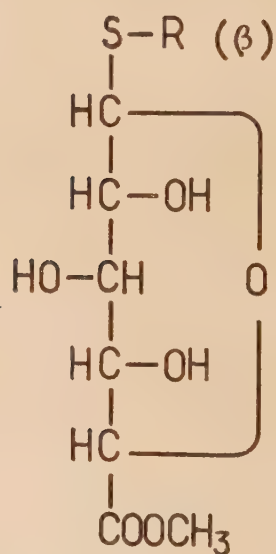
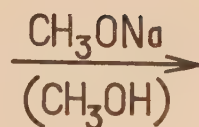
Bromo triacétylglucuronate de méthyle



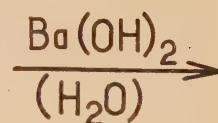
Thioglucuronide,
acide libre



Triacétylthioglucuronide,
ester méthylique



Thioglucuronide,
ester méthylique



Modes opératoires

a) Préparation du tétraacétylglucuronate de méthyle

1,38 g de soude en pastilles sont dissous dans 3750 ml de méthanol et on y ajoute 500 g de glucuronolactone * par portions de 100 g en agitant jusqu'à dissolution complète. Après 1 h de repos on évapore à sec (température $\leq 40^{\circ}\text{C}$). Le sirop visqueux obtenu (glucuronate de méthyle) est acétylé dans le mélange pyridine anhydre-anhydride acétique (1250 ml-1900 ml), la température étant maintenue en dessous de 5°C . Après un repos d'une nuit à -20°C on récolte environ 400 g de tétraacétylglucuronate de méthyle, forme β (rendement 37 %). La liqueur-mère est reprise par 1300 ml de chloroforme, lavée 4 fois à l'eau glacée, au bisulfate de potassium (10 %), au bicarbonate de sodium (solution saturée), puis à l'eau. La couche chloroformique, séchée sur SO_4Na_2 sec et décolorée au charbon actif, est évaporée à sec sous vide. Le sirop figé est repris par 1300 ml d'éthanol, décoloré au charbon actif, filtré et laissé une nuit à -20°C . On récolte environ 310 g de tétraacétylglucuronate de méthyle, forme α (rendement 29%).

Remarque : les 2 formes, α et β , du tétraacétylglucuronate de méthyle peuvent être utilisées pour la préparation du bromotriacétylglucuronate de méthyle. Lorsque les cristaux de la forme α sont légèrement colorés en beige, ils peuvent être recristallisés, avec décoloration au charbon actif, dans l'éthanol (rendement 95 %).

b) Préparation du bromotriacétylglucuronate de méthyle

125 g de tétraacétylglucuronate de méthyle sont dissous dans 600 ml de solution d'acide acétique saturée d'acide bromhydrique **. On laisse

* Corn Products Refining Co, New-York.

** La dissolution demande 10 minutes pour l'isomère α et 1 h pour l'isomère β (à température ambiante).

reposer 4 h puis on reprend par 1000 ml de chloroforme. On lave 3 fois à l'eau glacée, une fois au bicarbonate de sodium (solution saturée) et une fois à l'eau. La couche chloroformique, séchée sur SO_4Na_2 sec, décolorée au charbon actif et filtrée, est évaporée à sec sous vide. Le sirop très visqueux obtenu est dissous dans 200 ml d'éther. Après une nuit à -20°C (éviter la prise en masse) on récolte environ 100 g de bromotriacétylgucuronate de méthyle (rendement 76 %).

$F = 106-107^\circ\text{C}$.

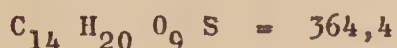
Remarque : le bromotriacétylgucuronate de méthyle est très instable, doit être conservé au dessiccateur et utilisé rapidement. Si les cristaux se décomposent (noircissement), on peut les recristalliser dans l'éther (1 partie poids dans 5 parties volume).

c) Préparation du Méthyl- β -D-thiogucuronide

A une solution refroidie à -78°C de 1,955 g (0,05 mole) de potassium dans 40 ml de méthanol absolu on ajoute 3,5 ml (environ 0,07 mole) de méthylmercaptan refroidi de la même façon, puis 19,86 g (0,05 mole) de bromotriacétylgucuronate de méthyle (en une portion). Le vase à réaction maintenu fermé est amené à se réchauffer peu à peu jusqu'à la température ambiante. La réaction débute vers -20° à -10°C avec précipitation de BrK . L'échauffement qui en résulte est limité à la température de $+10$ à $+20^\circ\text{C}$ au moyen d'un bain de glace-sel, jusqu'à ce que le bromoacétylgucuronate soit entièrement dissous (lorsqu'on opère sur de plus grandes quantités, il faut avoir soin de n'ajouter le bromoacétylgucuronate que par petites portions, afin de pouvoir contrôler l'élévation de température). Après un repos de 2h 1/2 à la température ambiante, on décolore au charbon actif, filtre et évapore à sec sous pression réduite jusqu'à obtention d'un sirop épais. Celui-ci est dissous dans 30 ml de pyridine anhydre, refroidi à -20°C et additionné de 30 ml d'anhydride acétique. Après une nuit à $+4^\circ\text{C}$ l'ensemble est dissous dans 100 ml de chloroforme, lavé 3 fois à l'eau, puis avec une solution de sulfate acide de potassium (10 %), à l'eau, avec une solution saturée de bicarbonate de sodium, puis une dernière fois

à l'eau. On sèche la couche chloroformique sur sulfate de sodium sec, on décolore au charbon actif, filtre et évapore à sec sous vide (température $\leq 40^{\circ}\text{C}$). Le résidu cristallise en général spontanément ; on le recristallise dans 80 ml de méthanol avec addition de charbon actif et laisse refroidir progressivement la solution jusqu'à -20°C . On récolte ainsi le triacétylméthyl- β -D-glucuronate de méthyle (aiguilles blanches) :

12,2 g (rendement 67 %) $F = 118-119^{\circ}\text{C}$



% calculés : C : 46,15 H : 5,53 S : 8,80

% trouvés : C : 46,03 H : 5,37 S : 8,95

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20^{\circ}} = \frac{-1,01^{\circ} \times 2}{0,00925 \times 1} = -21,8^{\circ} \text{ (chloroforme)}$$

Très facilement soluble dans l'acétone, le chloroforme, l'acétate d'éthyle, le dioxanne, le méthanol à chaud, l'éthanol à chaud ; facilement soluble dans le benzène à chaud ; peu soluble à froid dans l'éthanol, le méthanol et le benzène ; difficilement soluble dans l'éther de pétrole. Ne réduit la liqueur de Fehling qu'après hydrolyse acide.

En vue de la désacétylation et de la saponification, on dissout 14,6 g (0,04 mole) de triacétate brut dans 250 ml de méthanol absolu (vers 20 à 30°C) et après addition de 0,8 ml de méthylate de sodium 2N (dans le méthanol), on laisse reposer une nuit à $+4^{\circ}\text{C}$. On décolore au charbon actif, filtre et évapore à sec sous vide. On dissout le sirop obtenu * dans 100 ml de solution aqueuse saturée de baryte. Après 40 mn

* Ce sirop, le méthyl- β -D-thiogluconide, ester méthylique brut, peut être cristallisé dans l'alcool absolu (environ 50 ml) à -20°C .

à température ordinaire on précipite le baryum par une solution d'acide oxalique (4 g dans 30 ml d'eau) et on laisse reposer 3 h à +4°C. Après élimination de l'oxalate de baryum, on évapore à sec sous vide, on reprend le sirop par 50 ml de méthanol, on élimine les quelques cristaux d'oxalate de baryum restant insolubles et on évapore de nouveau à sec sous vide. Le résidu généralement cristallin est repris dans 30 ml d'acétone (additionnés le cas échéant de 1-2 ml de méthanol), débarrassé des quelques derniers cristaux d'oxalate de baryum insolubles, et laissé à -20°C. On récolte le méthyl- β -D-thiogluconide (forme acide libre) sous forme d'aiguilles incolores. La liqueur-mère partiellement évaporée donne une seconde récolte de cristaux. Rendement total : 7,1 g (79 %). Afin d'éliminer les derniers restes d'oxalate de baryum, on redissout la substance dans 5 parties (volumes) de méthanol, on traite au charbon actif, filtre et évapore à sec. Le résidu est recristallisé dans l'acétone additionné d'un peu de méthanol.

$$F = 135,5 - 136,5^{\circ} C$$

$$C_7 H_{12} O_6 S = 224,2$$

$$\% \text{ calculés : } C : 37,49 \quad H : 5,40 \quad S : 14,30$$

$$\% \text{ trouvés : } C : 37,33 \quad H : 5,60 \quad S : 14,15$$

$$[\alpha]_D^{22^{\circ}} = \frac{-2,59^{\circ} \times 2}{0,0901 \times 1} = -57,5^{\circ} (\text{eau})$$

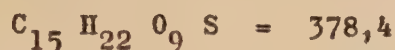
Ce corps est facilement soluble dans l'eau, le méthanol, l'éthanol, et le dioxanne, moyennement dans l'acétone à chaud, difficilement dans l'acétone à froid et l'acétate d'éthyle à chaud, très difficilement dans le chloroforme, le benzène et l'acétate d'éthyle à froid. Ne réduit la liqueur de Fehling qu'après hydrolyse acide.

d) Préparation de l'éthyl- β -D-thiogluconide

On procède de même que pour le dérivé méthylique (avec 5,1 ml d'éthyl-mercaptopan, soit environ 0,07 mole) à la différence qu'il suffit de refroidir au début à 0°C. Le triacétyléthyl- β -D-thiogluconate de méthyle

cristallise spontanément et est recristallisé dans 65 ml d'éthanol.

Rendement (pour 0,05 mole de bromoacétylglucuronate) : 11,3 - 12,3 g (55-60 %). Après une nouvelle recristallisation dans l'éthanol (4 parties volume) et séchage sur P_2O_5 sous vide à 78°C, le point de fusion est 106-107°C (quelques cristaux fondant un peu plus haut et de façon étalée).

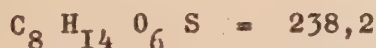


% calculés : C : 47,61 H : 5,86 S : 8,47

% trouvés : C : 47,82 H : 5,99 S : 7,21

$$[\alpha]_D^{26} = \frac{-1,18^\circ \times 2}{0,0621 \times 1} = -38,0^\circ \text{ (chloroforme)}$$

Les solubilités sont très voisines de celles du dérivé méthylé. Pour la préparation du dérivé acide libre 15,14 g (0,04 mole) de triacétate (recristallisé une fois) sont traités comme pour le dérivé méthylique par 1,5 ml de méthylate de sodium 2N. Après traitement à la baryte saturée (110 ml) et élimination du baryum, on évapore à sec sous vide, reprend par 50 ml de méthanol, filtre après une nuit à + 4° C et évapore à sec sous vide. Le résidu cristallin est dissous dans 40 ml d'acétone à chaud et additionné lentement de 48 ml d'acétate d'éthyle (il ne doit pas se produire de précipitation). Après filtration à chaud du résidu d'oxalate de baryum on obtient 4,6 g (rendement 48 %) d'éthyl-β-D-thioglucuronide (forme acide libre). La substance recristallisée dans 5 parties (volume) d'acétate d'éthyle additionnées de 1-2 parties (volume) de méthanol, fond à 154 - 155,5° C.



% calculés : C : 40,33 H : 5,92 S : 13,46

% trouvés : C : 40,48 H : 6,11 S : 13,25

$$[\alpha]_D^{22} = \frac{-1,15^\circ \times 2}{0,0254 \times 1} = -90,4^\circ \text{ (eau)}$$

Les solubilités sont très voisines de celles du dérivé méthylique.

e) Préparation du n-propyl- β -D-thioglucuronide

On procède comme pour le dérivé éthylique (5,9 ml de n-propylmercaptan, soit 0,07 mole environ). Le produit brut, cristallisant généralement spontanément, est recristallisé dans 3 parties (volume) d'éthanol avec décoloration sur charbon actif. On obtient 7,9 g de triacétyl-n-propyl- β -D-thioglucuronate de méthyle (rendement 40 %). Après une nouvelle recristallisation dans 4 parties (volume) d'éthanol, le composé fond à 95-96°C.



% calculés : C : 48,97	H : 6,17	S = 8,17
% trouvés : C : 49,17	H : 6,23	S = 7,26

$$[\alpha]_D^{26} = \frac{-1,66^\circ \times 2}{0,0786 \times 1} = -42,2^\circ \text{ (chloroforme)}$$

Les solubilités sont analogues à celles des homologues inférieurs.

Pour la préparation du dérivé acide libre, 15,7 g (0,04 mole) de triacétate recristallisé une fois sont traités de la même manière que pour le dérivé éthylique. Après une recristallisation dans 25 ml d'acétate d'éthyle on obtient 7,0 g (70% de rendement) de n-propyl- β -D-thioglucuronide (forme acide libre). Après une nouvelle recristallisation dans un mélange de 10 parties (volume) d'acétate d'éthyle chaud et de suffisamment d'acétone (généralement de l'ordre de 4 parties-volume) pour obtenir tout juste la dissolution à chaud, la substance fond à 136-139°C.



% calculés : C = 42,85 H = 6,39 S = 12,71

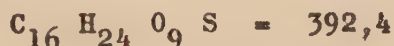
% trouvés : C = 42,57 H = 6,61 S = 12,00

$$[\alpha]_D^{23} = \frac{-0,76^\circ \times 2}{0,0179 \times 1} = -84,9^\circ \text{ (eau)}$$

Les solubilités sont très voisines de celles du composé éthylique.

f) Préparation de l'isopropyl- β -D-thioglucuronide

On procède comme pour le dérivé éthylique (5,9 ml d'isopropylmercaptan, soit environ 0,07 mole). Le produit brut (environ 16 g), cristallisant spontanément, est recristallisé avec décoloration au charbon actif dans 32 ml d'éthanol. On obtient 7,3 g de triacétylisopropyl- β -D-thioglucuronate de méthyle (rendement 37 %). La substance recristallisée à nouveau dans l'éthanol (3 parties-volume) fond à 99-101°C (quelques cristaux ne fondent qu'à 110-115°C).



% calculés : C : 48,97 H : 6,17 S : 8,17

% trouvés : C : 48,81 H : 6,04 S : 6,64

$$[\alpha]_D^{26} = \frac{-1,91^\circ \times 2}{0,1034 \times 1} = -36,9^\circ \text{ (chloroforme)}$$

La désacétylation et la saponification sont réalisées comme pour le dérivé propylique. (La substance brute obtenue n'a pas été recristallisée, ses constantes physiques n'ont pas été déterminées).

g) Préparation du phényl- β -D-thioglucuronide

A 1,995 g (0,05 mole) de potassium dissous dans 85 ml de méthanol absolu refroidi à 0°C, on ajoute 5,61 g (0,051 mole) de thiophénol, puis 19,86 (0,05 mole) de bromotriacétylgucuronate de méthyle en une portion. On agite et on refroidit dans un bain de glace (la température ne doit pas dépasser +20°C) ; le dérivé bromé se dissout peu à peu et on voit

apparaître graduellement le précipité de BrK. Après 1-2 h à la température ambiante la cristallisation du dérivé triacétylé débute (il est bon d'amorcer la cristallisation par ensemencement d'un petit cristal de dérivé triacétylé). Après 1 heure à -10°C on filtre ces cristaux mêlés au BrK et on les lave sur filtre avec 70 ml de méthanol froid, puis avec 2 fois 45 ml et 1 fois 25 ml d'eau ; on essore et on sèche au dessiccateur sous vide sur P_2O_5 (fines aiguilles parfois rassemblées en étoiles).

En évaporant à sec sous vide la liqueur-mère méthanolique, et en réacétylant le résidu sirupeux par le mélange pyridine-anhydride acétique, on peut obtenir une deuxième récolte de cristaux. Rendement total : 16,8g (79 %) de triacétylphényl- β -D-thiogluconate de méthyle. La substance recristallisée dans 4 parties (volume) de méthanol fond à $119,5 - 120^{\circ}\text{C}$.



% calculés : C : 53,51 H : 5,20 S : 7,52

% trouvés : C : 53,53 H : 5,30 S : 7,64

(après séchage sous vide à 100°C sur P_2O_5 pendant 3 heures).

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20^{\circ}} = \frac{-1,04^{\circ} \times 2}{0,0936 \times 1} = -22,2^{\circ} \text{ (chloroforme)}$$

Les solubilités sont très voisines de celles du dérivé méthylé.

En vue de la désacétylation et de la saponification, 17,06 g de triacétate brut dissous dans 250 ml de méthanol absolu sont additionnés de 0,9 ml de méthylate de sodium 2N. La suite du traitement est identique à celui du composé méthylé. Le résidu cristallise aussi spontanément. On recristallise dans 95 ml d'acétate d'éthyle additionné d'un peu de méthanol. On obtient ainsi 6,9 g (rendement 60 %) de phényl- β -D-thio-glucuronide (forme acide libre). On élimine les derniers restes d'oxalate de baryum par dissolution dans le méthanol, filtration, évaporation à sec sous vide et recristallisation dans l'acétone additionné d'un peu de

méthanol. Le composé fond à 159°C.



% calculés	:	C	:	50,34	H	:	4,93	S	:	11,20
% trouv	:	C	:	50,30	H	:	5,03	S	:	10,98

(après séchage sous vide à 100° C sur P₂O₅)

$$[\alpha]_D^{23^\circ} = \frac{-3,52^\circ \times 2}{0,0774 \times 1} = -90,9^\circ \text{ (eau)}$$

Les solubilités sont très voisines de celles du méthyl-thioglucuronide. Ne réduit la liqueur de Fehling qu'après hydrolyse acide.

h) Préparation du phényl-β-D-thioglucuronide marqué au ³⁵S

Il a été nécessaire de changer le mode opératoire par rapport au précédent pour deux raisons. D'une part la synthèse avec le thiophénol radioactif doit être réalisée sur de bien plus petites quantités ; le rendement de l'opération a tendance à baisser dans ce cas et pour le maintenir à un niveau raisonnable, il faut modifier partiellement le protocole expérimental. D'autre part, en raison de la forte radioactivité des produits utilisés, nous avons cherché à simplifier et raccourcir le plus possible les diverses manipulations. Cet effet a été obtenu en particulier en réalisant la désacétylation et saponification en une seule étape par le méthylate de sodium utilisé cette fois en quantité stoechiométrique et en présence de traces d'eau (méthanol ordinaire). On obtient alors le sel de sodium du phényl-β-D-thioglucuronide.

A 0,79 g de potassium dissous dans 35 ml de méthanol absolu et refroidi à 0°C, on ajoute 1,72 g de thiophénol ³²S et 0,785 g de thiophénol marqué au ³⁵S (50 mC), puis 8,1 g de bromotriacéthylglucuronate de méthyle en une portion *. On opère comme précédemment mais il faut attendre au

* Pour des quantités réduites au 1/3 de celles-ci, il s'est avéré nécessaire d'ajouter le dérivé bromé avec agitation mécanique continue et par petites fractions en 3^h 1/2 pour obtenir un rendement final acceptable.

moins 6 h après le début de la réaction pour obtenir la cristallisation complète du dérivé triacétylé (les 2 dernières heures à -20°C). On rince les cristaux sur filtre comme plus haut (par 20 ml de méthanol très froid, puis 3 fois à l'eau : 12,12 et 6 ml). La liqueur mère est réacétylée comme ci-dessus et livre une récolte supplémentaire de cristaux. Rendement total en triacétylphényl- β -D-thioglucuronate de méthyle (^{35}S) : 5,75 g (66%).

La totalité de ce composé dissous dans 125 ml de méthanol ordinaire (99°5) est additionnée de 7,4 ml de méthylate de sodium 2N (dans le méthanol absolu). Après une nuit à $+4^{\circ}\text{C}$ on décolore sur charbon actif, filtre et évapore à sec sous vide. Le résidu cristallin est dissous dans 3,7 ml d'eau (à 50°C), puis on ajoute goutte à goutte 18,3 ml d'éthanol en agitant constamment. Le précipité laiteux obtenu cristallise par frottement avec un agitateur. Après 3 h à 0°C on récolte 2,6 g de phényl- β -D-thioglucuronide (sel de sodium). La liqueur-mère additionnée de 25 ml d'éthanol dans les mêmes conditions donne une deuxième récolte de cristaux de 0,25 g. Rendement total : 2,85 g (68%).

i) Préparation du benzyl- β -D-thioglucuronide

A 1,955 g (0,05 mole) de potassium dissous dans 40 ml de méthanol absolu refroidi à 0°C on ajoute 6,3 g (0,051 mole) de benzylmercaptan (α -toluènethiol), puis 19,86 g (0,05 mole) de bromotriacétylgucuronate de méthyle en une portion. On agite à température ambiante, le composé bromé se dissout peu à peu et il y a précipitation de BrK. On refroidit de temps en temps dans la glace de telle sorte que la température ne dépasse pas $+20^{\circ}\text{C}$. Après un repos de 2h 1/2 à température ambiante on décolore au charbon actif, filtre et évapore à sec sous vide. Le résidu sirupeux obtenu est repris dans 100 ml d'éthanol à chaud, décoloré sur charbon actif et filtré. On ensemence avec un petit cristal et après une nuit à $+4^{\circ}\text{C}$ on obtient 8,4 g de benzyl- β -D-thioglucuronate de méthyle (rendement 37%) (entièrement désacétylé). Après recristallisation (et décoloration au

charbon actif) dans l'éthanol (10 parties-volume), la substance fond à 159-161°C.

La liqueur-mère du benzylthioglucuronate de méthyle brut est réacétylée par le mélange pyridine-anhydride acétique comme il a été dit pour le dérivé du méthyl-thioglucuronide. Le sirop obtenu après évaporation à sec sous vide est repris dans 23 ml d'éthanol à chaud, décoloré, filtré. Après une nuit à + 4°C on récolte 3,5 g de triacétylbenzyl- β -D-thioglucuronate de méthyle (rendement 16 %). Après recristallisation (et décoloration) dans 3 parties (volume) d'éthanol le composé fond à 101-104°C.

3,1 g (0,007 mole) de triacétylbenzyl-thioglucuronate de méthyle sont désacétylés par dissolution dans 45 ml de méthanol absolu avec addition de 0,05 ml de méthylate de sodium 2N. Après 1 nuit à +4°C on décolore, filtre et évapore à sec. Le résidu sirupeux est dissous dans 5 ml d'eau et par refroidissement graduel à 0°C donne 1,2 g de benzyl- β -D-thioglucuronate de méthyle (rendement 54 %). Après recristallisation dans l'eau (2 parties-volume) la substance fond à 158-159°C.

12,5 g (0,04 mole) de benzyl- β -D-thioglucuronate de méthyle brut sont saponifiés de la manière usuelle par dissolution dans 20 parties (volume) d'eau et addition de baryte (110 ml) en solution saturée. On opère ensuite comme pour le dérivé méthylé. Le résidu sirupeux de l'évaporation à sec est repris dans 50 ml d'acétate d'éthyle, filtré à chaud et après refroidissement graduel à 0°C on obtient 7,7 g de benzyl- β -D-thioglucuronide (forme acide libre) (rendement 65 %) F = 118° - 120° C. Ne réduit la liqueur de Fehling qu'après hydrolyse acide.

2. PREPARATION D'UN GLUCURONIDE VRAI : LE METHYL - β -D-GLUCURONIDE

Nous avons choisi la méthode de KOENIGS et KNORR (1901) et condensé le bromotriacétylglucuronate de méthyle avec le méthanol en présence de carbonate d'argent pour obtenir le triacétylméthyl- β -D-glucuronate de

méthyle^{*}. Celui-ci était ensuite désacétylé et saponifié en une étape par le méthylate de sodium utilisé en quantité stoechiométrique et en présence de traces d'eau (méthanol ordinaire). Nous obtenions ainsi le sel de sodium du méthyl- β -D-glucuronide qui s'est avéré cristallisable, à la différence de l'acide libre.

Mode opératoire

19,86 g (0,05 mole) de bromotriacétylglucuronate de méthyle dissous dans 350 ml de méthanol absolu sont additionnés de 10,5 g de carbonate d'argent sec et agités 6 h énergiquement en récipient fermé. On évacue de temps en temps le gaz carbonique formé. On décante alors le surnageant, on le porte à ébullition pour dissoudre les cristaux formés et on filtre à chaud sur charbon actif très pulvérulent. Le gâteau cristallin et les sels d'argent restant dans le vase à réaction sont épuisés et rincés sur filtre par 300 ml de méthanol ordinaire à ébullition. Les filtrats méthanoliques réunis, laissés une nuit à -10°C livrent une première récolte de 14,3 g de triacétylméthyl- β -D-glucuronate de méthyle (rendement 82 %). La liqueur mère réduite par évaporation sous vide au $1/20^{\circ}$ de son volume environ donne une deuxième récolte de cristaux de 1,5 g (rendement 9 %). Récolte globale : 15,8 g (rendement 91 % ; fines aiguilles blanches).

La substance recristallisée dans 4 à 5 parties (volume) de méthanol (rendement 90 %) fond à $153,5-154^{\circ}\text{C}$ (selon BERGER 1955 F = $151-152^{\circ}\text{C}$).

14 g (0,04 mole) de triacétylméthyl-glucuronate de méthyle sont dissous dans 280 ml de méthanol ordinaire et additionnés de 21 ml de méthylate de sodium 2N. Après une nuit à 4°C on décolore sur charbon animal, filtre et évapore à sec sous vide. Le résidu sirupeux est dissous dans 13,5 ml d'eau et on ajoute peu à peu, en agitant, 40 ml d'éthanol. Le précipité

* Corps déjà décrit et synthétisé en particulier (avec un rendement moindre) par condensation des mêmes dérivés en présence de cyanure de mercure (BERGER 1955).

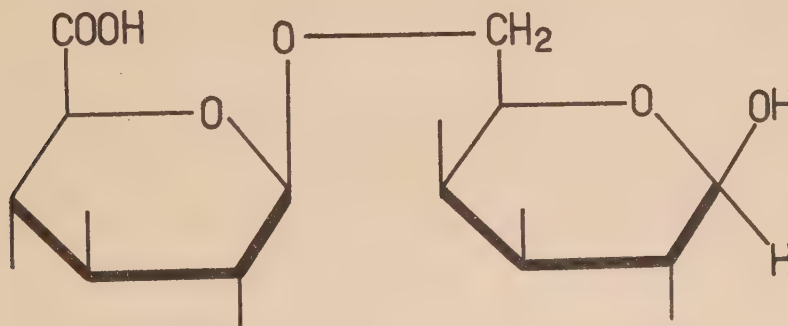
laiteux obtenu cristallise par frottement à l'aide d'un agitateur. Après une nuit à + 4°C on récolte 7,1 g de cristaux blancs de méthyl- β -D-glucuronide (sel de sodium) (rendement 76 %). Le filtrat, additionné à nouveau de 85 ml d'éthanol, donne dans les mêmes conditions une deuxième récolte de 0,9 g de cristaux (rendement 10 %). Rendement total : 8,0 g (86 %)

Ne réduit la liqueur de Fehling qu'après hydrolyse acide.

3. PREPARATION D'UN ACIDE ALDOBIOURONIQUE : LE GALACTOSYL- β -D-GLUCURONIDE

BUTLER et CRETCHER (1929) ont établi que la gomme arabique était un polymère de L-arabinose, L-rhamnose, D-galactose et D-glucuronate, et ont montré que l'hydrolyse acide de cette gomme libérait entre autres un acide aldobiouronique composé de galactose et d'acide glucuronique. Ces résultats ont été confirmés par HEIDELBERGER et KENDALL (1929). CHALLINOR HAWORTH et HIRST (1931), puis LEVENNE et TIPSON (1938), ont établi la structure exacte de cet acide aldobiouronique :

6-0- (β -D-glucopyranoseuronyl)-D-galactopyranose :



Nous inspirant de la méthode d'hydrolyse de BUTLER et CRETCHER nous avons mis au point un procédé permettant d'isoler cet acide aldobiouronique sous forme pure (légèrement contaminé par de l'acide glucuronique).

Mode opératoire

200 g de gomme arabique (Merck) en poudre fine sont dissous dans 1000 ml d'eau et additionnés de 15 ml d'acide sulfurique pur ($d = 1,83$). On chauffe très doucement jusqu'à ébullition que l'on maintient à une allure modérée pendant 13 h (temps calculé pour obtenir une dépolymérisation suffisante, mais la plus faible hydrolyse possible de l'acide aldobiouronique*). L'hydrolysate filtré est neutralisé au carbonate de baryum ajouté à chaud par petites portions jusqu'à ce que le milieu réactionnel ne précipite plus au chlorure de baryum ($pH \approx 6,6$). On filtre et on lave le précipité de sels de baryum avec 1500 ml d'eau que l'on adjoint au filtrat. L'ensemble est décoloré à chaud par le charbon animal (à 2 reprises). Le filtrat jaune pâle obtenu est additionné de 400 ml de résine Dowex 2 humide (faisant 0,6 à 0,7 m.e./ml) et l'ensemble est agité énergiquement pendant 1 h. Le surnageant, séparé par décantation, est à nouveau traité par 400 ml de résine Dowex 2 pendant une heure. Les 2 portions de résine sont rincées très abondamment à l'eau distillée pour éliminer les glucides non anioniques : 3 à 4 fois par décantation, puis 5 à 6 fois sur Büchner. La résine est ensuite mise en suspension dans 4 litres d'eau distillée, agitée 1/2 h, rincée 2 fois par décantation à l'eau distillée, abandonnée 1 nuit à $+ 4^{\circ}C$ en suspension dans 2 litres d'eau, rincée à nouveau 2 fois par décantation. On répète encore trois fois cet ensemble d'opérations. On élue ensuite les anions glucidiques fixés (surtout de l'acide aldobiouronique et un peu d'acide glucuronique), par la quantité stoechiométrique d'acide sulfurique 2 N (déterminée par titrage préalable de la résine par cet acide sulfurique en suivant la fixation de l'acide par mesure du pH). Cette quantité stoechiométrique d'acide sulfurique 2N est ajoutée à la résine à éluer mise en suspension dans 600 ml d'eau distillée et l'ensemble est agité 1 h. On vérifie que le surnageant ne précipite pas au chlorure de baryum, on filtre et on

* Ainsi que le révèle l'analyse chromatographique, voir plus loin.

rinçer 3 fois la résine à l'eau distillée sur filtre.

Le rendement total en acide aldobiouronique (calculé par titrage acidimétrique) est de 33 g environ (en solution aqueuse, ramenée ensuite pour utilisation à un titre de 20 % par évaporation sous vide de la liqueur-mère).

Analyse chromatographique

Mode opératoire : chromatographie sur papier Whatman 2, descendante, à écoulement continu, en mélange Butanol-acide acétique-eau (PARTRIDGE 1948). Révélation au phtalate d'aniline acétique et à l'aide d'un révélateur spécifique des acides (bleu de bromophénol) (KENNEDY et BARKER 1951). L'identification des divers glucides a été faite à l'aide de témoins internes (L-arabinose pur "Biochimiques Roche", L-rhamnose "Pfanztühl, U.S.A., C.P.", D-galactose 2 fois recristallisé, acide D-glucuronique 2 fois recristallisé, acide aldobiouronique HEIDELBERGER et coll. (1929)).

Résultats

Dans l'hydrolysât brut (13 h d'hydrolyse) on décèle la présence de L-arabinose, L-rhamnose, D-galactose, acide aldobiouronique et d'un peu d'acide glucuronique. Lorsque le temps d'hydrolyse est raccourci, il y a apparition de gros spots non mobiles correspondant à des polymères acides peu dégradés. Si le temps d'hydrolyse est augmenté, il n'y a pas de différences appréciables par rapport au temps d'hydrolyse de 13 h.

L'éluat du traitement à la résine Dowex 2 contient une grosse quantité d'acide aldobiouronique avec une faible contamination d'acide glucuronique (de l'ordre de 1 %) et pas trace d'autres glucides. Lorsque les lavages de la résine sont moins soigneux, on constate l'apparition de quantités importantes d'arabinose, de rhamnose et de galactose.

Le surchargeant du traitement à la résine Dowex 2 contient de l'arabinose, du rhamnose et du galactose, mais pas trace de glucides acides.

Une révélation spécifique des lactones (ABDEL-AKHER et SMITH 1951) n'a pas permis de déceler de traces de lactonisation des produits chromatographiés.

4. - ORIGINE DES AUTRES GLUCURONIDES UTILISES DANS CE TRAVAIL

Les glucuronides (ou dérivés) suivants ont été synthétisés par le Dr A. BERGER (1956) dans le laboratoire du Pr B. HELFERICH à Bonn (Allemagne) :

méthyl- β -D-glucuronide (amide)
 éthyl- β -D-glucuronide (amide)
 isopropyl- β -D-glucuronide (amide)
 cyclohexyl- β -D-glucuronide (acide libre)
 cyclohexyl- β -D-glucuronide (ester méthylique)
 phényl- β -D-glucuronide (acide libre)
 phényl- β -D-glucuronide (ester méthylique)
 benzyl- β -D-glucuronide (acide libre)
 benzyl- β -D-glucuronide (ester méthylique)
 crésyl- β -D-glucuronide (acide libre)
 crésyl- β -D-glucuronide (ester méthylique)
 β -D-glucosyl- β -D-glucuronide (amide).

Deux glucuronides étaient des produits biosynthétiques (extraits des urines, "glucuronoconjugués", collection du laboratoire) :

L-menthyl- β -D-glucuronide
 bornyl- β -D-glucuronide.

Enfin le phénolphtaléine- β -D-glucuronide (sel de cinchonidine) était le produit commercial (Sigma Chemical Co, Saint-Louis, Missouri, U.S.A.).

CHAPITRE IV

PROPRIETES ET PURIFICATION DE LA β -GLUCURONIDASE D'ESCHERICHIA COLI

I - INTRODUCTION

L'étude des modalités et des mécanismes de formation de la β -glucuronidase chez E. coli suppose une bonne connaissance préalable des propriétés de cet enzyme. C'est pourquoi nous avons entrepris, en un premier temps, l'analyse des diverses caractéristiques biochimiques de la glucuronidase in vitro dans un extrait cellulaire brut. Nous avons par ailleurs mis au point un procédé de purification de l'enzyme et comparé les propriétés de cette préparation purifiée avec celles de l'extrait brut.

a) Dosage de l'activité β -glucuronidasique

La méthode la plus courante et la plus pratique de dosage de l'activité β -glucuronidasique est celle de FISHMAN et collaborateurs (TALALAY et collaborateurs 1946, FISHMAN et collaborateurs 1948). Elle consiste à mesurer la vitesse d'hydrolyse d'un β -glucuronide, le phénolphtaléine- β -D-glucuronide (PPU) en dosant l'aglycone libéré, la phénolphtaléine, par spectrophotométrie en milieu alcalin.

Méthode standard de dosage de l'activité glucuronidasique

(adaptée de celle de TALALAY et collaborateurs 1946).

Nous opérons sur un mélange réactionnel de volume total 2 ml, en tampon phosphate-soude (CLARK et LUBS 1916) $2 \cdot 10^{-2} M$ à pH 7,1 et en présence de PPU à la concentration finale de $2 \cdot 10^{-4} M$ *) et à la température de 38°C. La réaction d'hydrolyse est mise en route par addition de l'extrait enzymatique en quantité connue et arrêtée par addition de 0,5 ml de tampon glycine-soude (SØRENSEN 1912) 0,5 M à pH 11,5 ; il en résulte une alcalinisation du milieu (pH > 10) qui arrête immédiatement toute réaction

* Concentration à laquelle la variation de la vitesse d'hydrolyse en fonction de la teneur en substrat est réduite au minimum.

enzymatique et fait virer la phtaléine à sa forme colorée. Celle-ci est dosée par mesure de l'absorption à $550\text{ m}\mu$ dans un spectrophotomètre de Jean et Constant préalablement étalonné à l'aide d'une solution de phénolphtaléine de titre connu *. Il est nécessaire de conduire l'hydrolyse en présence de β -mercaptoéthanol pour protéger les groupements sulfhydryles de l'enzyme (la concentration nécessaire à la réactivation maximum varie selon que l'on a affaire à un extrait brut ou à une préparation purifiée, voir plus loin). Dans les conditions où nous opérons la vitesse d'hydrolyse demeure constante en fonction du temps jusqu'à 25 % d'hydrolyse au moins ; elle est par ailleurs proportionnelle à la concentration d'enzyme.

b) Source d'enzyme

Nous avons choisi la souche ML30 al d'E. coli qui synthétise la glucuronidase "constitutivement", c'est-à-dire en l'absence d'inducteur exogène (voir chap. VI § 8). Outre l'avantage d'une production accrue d'enzyme (cette souche constitutive synthétise beaucoup plus d'enzyme que la souche sauvage induite au maximum), l'emploi de cette souche permettait d'économiser la consommation en glucuronides inducteurs.

Les meilleures conditions pour l'obtention d'une haute activité glucuronidasique consistent à cultiver la souche ML30 al en milieu liquide synthétique "63" (SISTROM 1958) et sur glucuronate de potassium à 10 mg/ml comme source d'énergie en aérobiose à 37° ; il faut arrêter la culture légèrement avant la fin de la phase exponentielle de croissance pour éviter une perte d'activité.

Nous avons réalisé cette culture dans un fermentateur à grande échelle (40 litres de milieu) et en aérobiose, et récolté ainsi une suspension cellulaire titrant 1,25 mg de poids sec bactérien/ml. Cette suspension

* Dans les conditions où nous opérons, la loi Beer-Lambert est vérifiée jusqu'à $40\text{ m}\mu$ moles de phénolphtaléine $\times\text{ ml}^{-1}$ au moins.

était lavée par centrifugation en tampon phosphate $2.10^{-2}M$ pH 7,1 et le culot bactérien humide était conservé gelé à $-20^{\circ}C$. L'activité enzymatique était ainsi stable pendant plusieurs mois (plus de 8 mois).

c) Préparation d'un extrait enzymatique brut

La β -glucuronidase d'E. coli ML30 est un enzyme intracellulaire (voir chap. V p. 104), non libéré dans le milieu de culture*. D'autre part, ainsi que nous le verrons au chapitre V, le PPU ne pénètre pratiquement pas dans la cellule. Il est donc nécessaire d'extraire la glucuronidase de la cellule avant de doser son activité.

Nous avons essayé les quatre types d'extraction suivants :

1°) Traitement au toluène (agitation de la suspension cellulaire 20 minutes à $37^{\circ}C$ en présence de 1/50 de volume de toluène) qui détruit la semi-perméabilité des cellules.

2°) Désintégration par oscillation sonique (oscillateur Raytheon, 9KC) d'une durée de 10 minutes à $0^{\circ}C$; on obtient ainsi, après une centrifugation éliminant les débris cellulaires, une phase limpide et homogène.

3°) Extraction par l'acétone à $4^{\circ}C$ ("poudre acétonique", UMBREIT et coll. 1957, extraite ensuite au tampon phosphate).

* Certains auteurs (BUEHLER et coll. 1951 ; DOYLE et coll. 1955 ; SMITH et MILLS 1950 ; BEALL et GRANT 1952) constatent la présence de la glucuronidase dans le milieu de culture d'E. coli . Les conditions dans lesquelles ils réalisent ces cultures (de 1 à 10 jours d'agitation à 37°) ne laissent aucun doute sur la nature du phénomène : il s'agit de cultures âgées où la majorité des cellules doit être lysée avec libération du contenu cellulaire dans le milieu ambiant.

4°) Broyage des cellules bactériennes (culot de centrifugation préalablement gelé dans la neige carbonique) à + 4°C dans un mortier en présence d'alumine, et extraction du broyat par le tampon phosphate.

On voit (tableau I) que le meilleur rendement d'extraction est obtenu par désintégration sonique. Ce rendement est, dans de larges limites, indépendant de la densité de la suspension cellulaire, ainsi que du temps du traitement (entre 5 et 30 minutes). L'addition de mercaptoéthanol ($10^{-3}M$) à la suspension avant extraction augmente de 20 % le rendement en activité extraite *).

Tableau IV - 1

Rendement d'extraction de la glucuronidase des cellules d'E.coli ML30 al

Mode d'extraction	Activité extraite
Traitement au toluène	3 7
Désintégration sonique	5 0
Poudre acétinique	3
Broyage à l'alumine	4 4

- L'extraction a été effectuée ici en l'absence de protecteur des groupements -SH.
- L'activité enzymatique, mesurée en l'absence de protecteur des groupements -SH, est exprimée en $m\mu$ moles de PPU hydrolysé $\times mn^{-1} \times mg^{-1}$ de poids sec bactérien initial.
- La suspension cellulaire initiale (en tampon phosphate $2.10^{-2}M$; pH 7,1) faisait 9 mg de poids sec/ml.

* Cette activité étant mesurée de toute manière en présence de mercaptoéthanol ($10^{-3}M$).

2. PURIFICATION DE LA β -GLUCURONIDASE d'E. COLI ML30 a1

Le point de départ était l'extrait cellulaire brut préparé par désintégration sonique et titrant entre 15 et 20 mg de protéines/ml. Toutes les opérations ont été conduites en présence de β -mercaptoéthanol 10^{-2} M et en milieu tampon de phosphate $2 \cdot 10^{-2}$ M à pH 7,1 (sauf la dernière étape).

L'activité spécifique de la préparation (unités d'enzyme par mg de protéine) a pu être multipliée par un facteur supérieur à 10 grâce aux quatre étapes de purification suivantes (tableau 2).

L'étape I consistait en une élimination du matériel non protéique. L'extrait brut était abandonné 1 heure à température ambiante en présence de désoxyribonucléase (200 μ g/ml), de ribonucléase (1000 μ g/ml) et de chlorure de magnésium (M/15). Les protéines étaient ensuite précipitées à 0°C par le sulfate d'ammonium à 60 % de saturation, et le précipité, redissous dans le minimum de tampon phosphate, était dialysé à + 5°C contre ce même tampon. Il est nécessaire de prolonger cette dialyse (par exemple 4 x 15 heures et 1 x 50-70 heures) car le matériel nucléique ne dialyse que très lentement. On arrive ainsi à éliminer la plus grosse partie des nucléotides.

L'étape II était un fractionnement au sulfate d'ammonium à 0°C entre 30 et 40 % de saturation (concentration initiale de protéines ramenée à 10 mg/ml). Le précipité redissous dans le minimum de tampon phosphate et dialysé contenait la majeure partie de l'activité glucuronidasique. Il n'a pas été possible de resserrer davantage les limites du fractionnement.

Les deux dernières étapes consistaient chacune en une chromatographie sur colonne de diéthylaminoéthylcellulose (DEAEC) * à 5°C, suivie d'une élution fractionnée par gradient de concentration saline (SOBER, GUTTER et WYCKOFF, 1956). Nous utilisions un gradient linéaire de chlorure de sodium (0 à 4 M), avec une vitesse d'écoulement d'une goutte/20-25 secondes ; le

* Brown Co, Corvalis (Orégon) U.S.A. ; "Reagent Grade".

volume des fractions recueillies était de 3 ml. La quantité totale de protéine mise en oeuvre variait considérablement d'une expérience à l'autre (2 à 100 mg) sans que cela retentisse sur les résultats.

La 1ère chromatographie était conduite en tampon phosphate $2.10^{-2}M$ à pH 7,1 (étape III). On recueillait la majorité de l'activité déposée sur la colonne (environ 85 %) dans 4 fractions successives de 3 ml (a, b, c, d, tableau 2). A pH 6,5 (tampon phosphate) les résultats ne varient pratiquement pas, mais à pH 7,7 (tampon Tris-Acétate $10^{-2}M$) le rendement en enzyme tombe très bas.

Au cours de l'étape IV, la fraction b de l'étape précédente était rechromatographiée dans les mêmes conditions mais à pH 6,5 au lieu de 7,1. La presque totalité de l'enzyme mis en oeuvre (98 %) se retrouve, ici encore, dans 4 fractions successives (a, b, c, d,) de 3 ml, avec un facteur de purification supplémentaire variant de 1,4 à 2,2 selon la fraction.

Légende du Tableau IV-2

- La quantité d'acides nucléiques était évaluée par détermination du rapport entre l'absorption lumineuse à $280 m\mu$ et celle à $260 m\mu$ (méthode de WARBURG et CHRISTIAN 1941).
- Les protéines étaient dosées généralement par la méthode du biuret (GORNALL, BARDAWILL et DAVID 1949). En fin de purification, lorsque la teneur en protéines tombait en dessous du seuil de sensibilité de la méthode du biuret, nous utilisions une méthode néphélométrique (précipitation à l'acide trichloracétique et mesure photométrique du louche obtenu ; méthode de STADTMAN, NOVELLI et LIPMANN 1951). L'étalon, dans les deux cas était la sérumalbumine de boeuf.
- L'activité glucuronidasique est exprimée en $m\mu$ moles de PPU hydrolysé $x mn^{-1}$.

DIFFERENTES ETAPES DE PURIFICATION DE LA β -GLUCURONIDASE D'E. COLI ML 30 AL

Etape	Volume total (ml)	Acides nucléiques (°)	Activité totale (unités d'enzyme) (A)	Protéines totales (mg) (P)	Activité spécifique A/P	Rendement (°°)	Facteur de purification (°°)
<u>Extrait sonique brut</u>	307	> 20	1.535.000	3.770	407	100	1
ETAPE I Elimination du matériel non protéique	142	2	1.530.000	3.140	487	100	1,2
Etape II Fractionnement $SO_4(NH_4)_2$	7	0,3	1.090.000	770	1.415	71	3,5
ETAPE III 1° Chromatographie s/DEAEC pH 7,1	Fraction a 21 Fraction b 21 Fraction c 21 Fraction d 21	- - - -	248.000 398.000 208.000 71.500	115 140 101,5 52,5	2.160 2.840 2.050 1.360	16 26 13,5 4,5	5,3 7 5 3,3
ETAPE IV 2° Chromatographie s/DEAEC pH 6,5 Fraction IIIB	Fraction a 9 Fraction b 9 Fraction c 9 Fraction d 9	- - - -	50.400 223.500 82.100 35.800	8,06 52,4 20,6 6,63	6.250 4.260 3.980 5.400	3 14,5 5 2	15,4 10,5 9,8 13,3

(°) % du poids total.

(°°) Par rapport à l'extrait brut.

Signalons que la concentration de mercaptoéthanol utilisée au cours de la purification joue un rôle important. Si l'on se contente d'ajouter du mercaptoéthanol à la concentration de $10^{-3}M$ (au lieu de $10^{-2}M$), le rendement en glucuronidase récupérée diminue sensiblement, surtout dans les chromatographies sur DEAE.

On voit sur la fig. 1 que l'activité glucuronidasique recueillie au cours de la 1ère chromatographie se présente sous la forme d'un pic d'élution étroit et bien isolé. Les caractéristiques de ce pic ne changent pas après la 2ème chromatographie. On peut donc conclure à un haut degré de purification de la préparation ainsi obtenue.

Cette conclusion pourrait paraître peu compatible avec l'ordre de grandeur du facteur de purification final (10 à 15 fois selon la fraction). Il faut rappeler cependant que la souche constitutive ML30 a produit une très importante quantité d'enzyme et qu'on se trouve probablement ici dans une situation analogue à celle de la β -galactosidase obtenue à partir des souches constitutives correspondantes. Certaines d'entre elles synthétisent en effet jusqu'à 7 % de galactosidase par rapport aux protéines totales ; on ne peut donc espérer dans ce cas une purification supérieure à 13-14 fois l'activité spécifique de départ (COHN 1957; WALLENFELLS et coll. 1959).

3. PROPRIETES DE LA β -GLUCURONIDASE D' E. COLI IN VITRO

La plupart des propriétés biochimiques de la glucuronidase d'E. coli ML30 a sont identiques, dans l'extrait cellulaire brut et dans la préparation purifiée. Aussi étudierons-nous ensemble les deux cas, en signalant s'il y a lieu les différences constatées.

a) Stabilité de la glucuronidase

La glucuronidase d'E. coli est un enzyme extrêmement stable. Des extraits bruts abandonnés à la température ambiante accusent une perte d'activité relativement peu élevée après 4 jours (10-20 %). Ces mêmes extraits

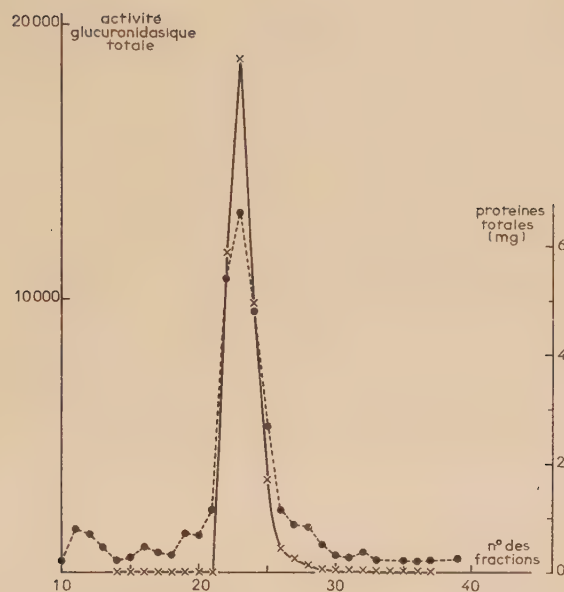


Fig. IV-1

ELUTION FRACTIONNEE DE LA GLUCURONIDASE D'E. COLI ADSORBEE SUR DEAE -
CELLULOSE

(L'activité enzymatique totale est exprimée en $m\mu$ moles de PPU hydrolysé $\times mn^{-1}$).



activité glucuronidasique totale
protéines totales.

conservés à + 5°C gardent encore 80 % de leur activité environ après 3 mois, 40 % après un an et 10 % après 2 ans. La préparation purifiée est tout aussi stable : conservée à +5°C elle n'avait perdu que 30 % de son activité en 7 mois.

b) Réactivation de la glucuronidase par les agents sulfhydrylés et chélateurs.

La cystéine, l'acide β -mercaptoacétique, le β -mercaptoéthanol utilisés à la concentration de 10^{-3} M activent fortement l'extrait glucuronidasique brut. Il en va de même pour le sel disodique de l'acide éthylène-diaminetétracétique (complexon) ainsi que pour l'extrait bouilli lui-même rajouté à l'extrait actif (nous verrons cependant que cela ne peut être imputé à l'existence d'un coenzyme).

Avec le β -mercaptoéthanol, que nous utilisons de façon régulière, cette activation est bien reproductible et, pour l'extrait brut, ne varie pas entre les concentrations 10^{-4} M et 10^{-2} M de ce corps ; elle est en outre instantanée. Les choses sont différentes avec l'enzyme purifié où l'activation est plus prononcée à 10^{-2} M qu'à 10^{-3} M de mercaptoéthanol et où cette activation augmente au cours du temps pour atteindre un maximum stable entre 1 et 2 heures de contact avec le mercaptoéthanol à 10^{-2} M.

On en conclut qu'un ou plusieurs groupements sulfhydryles, inactivables de manière réversible, sont présents dans la structure moléculaire de la glucuronidase d'E. coli.

c) pH optimum

Le pH optimum d'activité de l'enzyme purifié, mesuré en tampon véronal-acétate de MICHAELIS (1931), se situe vers 7,0-7,1, mais cette activité maximum ne varie pas notablement entre pH 6,6 et 7,4. Il en va sensiblement de même pour l'enzyme de l'extrait brut.

d) Action de divers ions sur l'activité glucuronidasique

Nous avons étudié l'influence de divers ions sur l'activité d'un extrait brut en tampon Tris (= tris [-hydroxyméthyl-] amino-méthane)

0,05 M à pH 7,3 (GOMORI 1946). Les ions suivants (10^{-2} ions-grammes/litre) sont pratiquement sans influence sur l'activité enzymatique : Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Mg^{++} , Ca^{++} , $\text{PO}_4^{=}$, $\text{MoO}_4^{=}$. Les ions Mn^{++} , Co^{++} inhibent fortement cette activité (70 %) et les ions Cu^{++} et Zn^{++} la suppriment totalement (même concentration que ci-dessus).

e) Recherche d'un éventuel coenzyme de la glucuronidase

L'activité de l'extrait brut n'est pas diminuée par la dialyse effectuée dans différentes conditions (tampon phosphate, Tris, véronal ; pH 6,5 ; 7,1 ; 7,3 ; 7,7) ; il n'y a donc aucune raison de penser que l'action de la glucuronidase d'E. coli requière un coenzyme pour s'exercer.

f) Etude cinétique de la glucuronidase d'E. coli - Détermination des constantes de HENRI-MICHAELIS de deux substrats

Nous avons étudié la variation de la vitesse d'hydrolyse de deux glucuronides, le phénolphtaléine- β -D-glucuronide (PPU) et le méthyl- -D-glucuronide (MU), en fonction de leur concentration.

La vitesse d'hydrolyse du PPU était déterminée comme il a été dit plus haut. Celle du MU était évaluée par mesure du pouvoir réducteur de l'acide glucuronique produit par hydrolyse. Nous avons tout d'abord vérifié qualitativement à l'aide de la liqueur de Fehling (voir LOISELEUR 1954) que l'action de la glucuronidase sur le MU entraînait l'apparition d'un pouvoir réducteur. Le MU était incubé 40 minutes à 38°C à la concentration de 10^{-1}M en tampon phosphate pH 7,1 et en présence d'une préparation enzymatique brute de haute activité*. Par addition d'un volume égal de liqueur de Fehling à chaud on obtenait une réaction fortement positive, plus forte que celle donnée par l'acide glucuronique 10^{-2}M dans les mêmes conditions ; ceci permet de conclure à une hydrolyse supérieure à 10 % du MU mis en oeuvre. Le MU est donc un substrat de la glucuronidase.

Nous avons mesuré quantitativement la vitesse d'hydrolyse du MU par la méthode colorimétrique de SOMOGYI (1945) et NELSON (1944). Comme pour

* Hydrolysant $200 \mu\text{moles PPU} \times \text{mn}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ de poids sec.

le PPU, nous opérons en tampon phosphate $2.10^{-2}M$ à pH 7,1 dans un volume final de 2ml et à $38^{\circ}C$. La réaction enzymatique était arrêtée par l'alcalinisation ($> pH10$) consécutive à l'addition du réactif de SOMOGYI. L'absorption lumineuse était mesurée au spectrophotomètre de Jean et Constant à $750 m\mu$. L'utilisation de substances protectrices de groupements sulfhydryles, comme la cystéine ou le mercaptoéthanol, n'est pas possible ici, car à la concentration où on les emploie, le pouvoir réducteur de ces corps est trop important en comparaison de celui de l'acide glucuronique. Cependant le complexon, qui active nettement l'hydrolyse du PPU par la glucuronidase, est ici sans effet. Nous n'avons donc pas utilisé d'agents activateurs dans les expériences portant sur l'hydrolyse du MU.

L'examen des figures 2 et 3 révèle que la vitesse d'hydrolyse du PPU et du MU par la glucuronidase ne varie pas en fonction de leur concentration selon la loi classique de saturation. Nous constatons un maximum de la vitesse à $1,5.10^{-4}M$ pour le PPU et à $2.10^{-1}M$ pour le MU, après quoi la vitesse diminue nettement quand la concentration de substrat augmente. Pour le PPU la vitesse d'hydrolyse suit la loi classique de HENRI-MICHAELIS à partir de $8.10^{-6}M$ au moins et jusqu'à $1,5.10^{-4}M$ avec une constante $K_S = (3,12 \pm 0,19) 10^{-5}M^{**}$ dans les conditions standardisées citées (à $38^{\circ}C$, en présence de cystéine ou mercaptoéthanol $10^{-3}M$, en tampon phosphate $2.10^{-2}M$ à pH 7,1 et également en milieu minéral "63" à pH 7,0). Cette constante est la même pour la préparation enzymatique brute ou l'enzyme purifié provenant de la souche constitutive ML 30 al ; elle est également identique pour la glucuronidase de la souche ML30 induite par le MU (voir chapitre VI).

* La loi de Beer-Lambert est suivie dans ces conditions jusqu'à $400 m\mu$ moles $\times ml^{-1}$ au moins.

** Avec un coefficient de sécurité de 95 %.

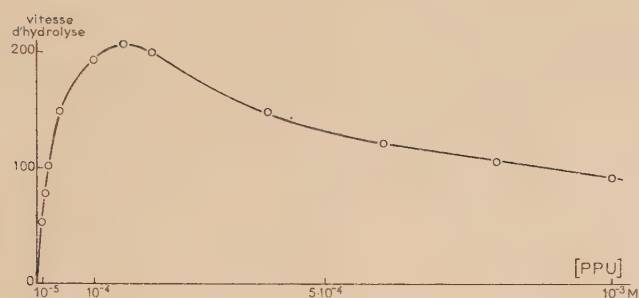


Fig. IV-2

VARIATION DE LA VITESSE D'HYDROLYSE DU PPU EN FONCTION DE SA CONCENTRATION

(La vitesse d'hydrolyse est exprimée en $m\mu$ moles de PPU hydrolysé $\times mn^{-1}$ et ramenée à 1 mg de poids sec de l'extrait enzymatique).

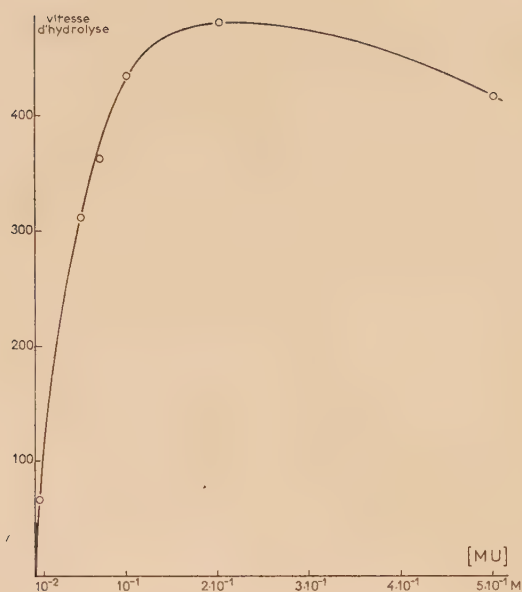


Fig. IV-3

VARIATION DE LA VITESSE D'HYDROLYSE DU MU EN FONCTION DE SA CONCENTRATION

(La vitesse d'hydrolyse du MU est exprimée en $m\mu$ moles de MU hydrolysé $\times mn^{-1}$ et ramenée à 1 mg de poids sec de l'extrait enzymatique).

Pour le MU, la loi de HENRI-MICHAELIS est suivie à partir de $5 \cdot 10^{-4} M$ au moins et jusqu'à $2 \cdot 10^{-1} M$, avec une constante $K_S = (3,8 \pm 0,5) 10^{-2} M^*$ ($38^\circ C$, tampon phosphate $2 \cdot 10^{-2} M$ pH 7,1 pour l'extrait brut de la souche ML30 a1).

A titre de comparaison, la vitesse d'hydrolyse maximum tirée de l'équation de HENRI-MICHAELIS, V_{max} , est de 258 $m\mu$ moles de PPU hydrolysé $\times mn^{-1} \times mg^{-1}$ de poids sec d'un extrait brut donné (vitesse maximum observée 208) contre 500 $m\mu$ moles de MU hydrolysé $\times mn^{-1} \times mg^{-1}$ de poids sec du même extrait brut (vitesse maximum observée 480). Autrement dit, le MU, qui a une affinité 1200 fois plus faible que le PPU pour la glucuronidase d'E. coli, est hydrolysé 2 fois plus vite que le PPU à la vitesse maximum théorique.

Le fait qu'au delà d'une certaine limite, la vitesse d'hydrolyse s'abaisse quand augmente la concentration du PPU ou du MU doit vraisemblablement être attribué à un phénomène d'inhibition de l'activité enzymatique par le substrat.

Il convient enfin de signaler ici un résultat qui sera exposé au chapitre VI : les thioglucuronides, bien que doués d'affinité pour la glucuronidase, ne sont pas hydrolysables par elle.

g) Inactivation thermique de la glucuronidase

Nous avons étudié l'inactivation thermique de la glucuronidase (extrait sonique brut) à $58^\circ C$ ($\pm 0,05$) en tampon phosphate $2 \cdot 10^{-2} M$ à pH 7,1 et agissant sur le PPU. Cette inactivation suit une loi exponentielle jusqu'à 1,4 % d'activité résiduelle (fig.4). Il est donc hautement vraisemblable que jusqu'à cette limite au moins, l'activité de cet enzyme sur le PPU est liée à une structure moléculaire homogène.

* Avec un coefficient de sécurité de 95 %.

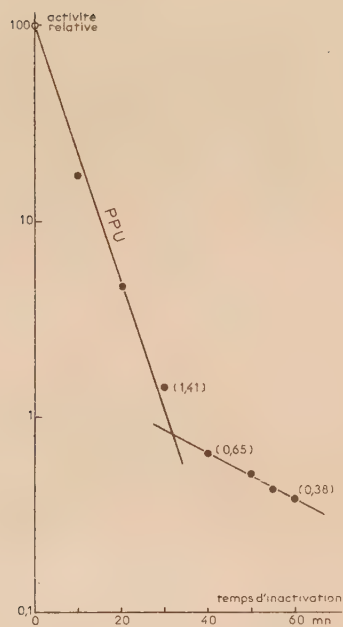


Fig. IV-4

INACTIVATION THERMIQUE DE LA GLUCURONIDASE d' E. COLI

(à 58° C)

h) Spécificité de la glucuronidase - Détermination de l'affinité de divers glucuronides pour cet enzyme

La vitesse d'hydrolyse du PPU par la glucuronidase est inhibée de manière compétitive par les divers glucuronides suivants : méthyl-, éthyl-, propyl-, et phényl- β -D-thioglucuronide, acide aldobiouronique (galactosyl- β -D-glucuronide), amide du méthyl- β -D-glucuronide. Cette inhibition est de type strictement compétitif, ainsi qu'on peut le constater sur la figure 5 par exemple : la vitesse d'hydrolyse maximum du PPU ($V_{\max}$ de la relation de HENRI-MICHAELIS) n'est pas modifiée par la présence de TPU. Cette inhibition suit dans tous les cas la loi classique qui régit l'action des inhibiteurs compétitifs ; la valeur des constantes de dissociation K_i est donnée dans le tableau 3. D'autres glycosides comme le méthyl- β -D-glucoside, le méthyl- β -D-galactoside, le méthyl- β -D-xyloside n'inhibent pas l'hydrolyse de PPU, même avec un rapport de concentration molaire inhibiteur/substrat de 1000 dans le premier cas et de 2500 dans les deux autres cas. Si ces corps avaient une affinité non décelée dans les conditions où nous travaillons, leurs constantes de dissociation seraient $K_i \gg 2 \cdot 10^{-1} \text{M}$ pour le méthylglucoside et $K_i \gg 5 \cdot 10^{-1} \text{M}$ pour le méthylgalactoside et le méthylxyloside.

Notons que ces constantes de dissociation K_i sont identiques pour l'enzyme de la préparation brute ou purifiée (en tampon phosphate ou en milieu 63) et pour celui de la souche ML30 al ou de la souche ML30 induite par MU (voir chapitre VI), tout au moins en ce qui concerne le propyl- et le phényl- β -thioglucuronide.

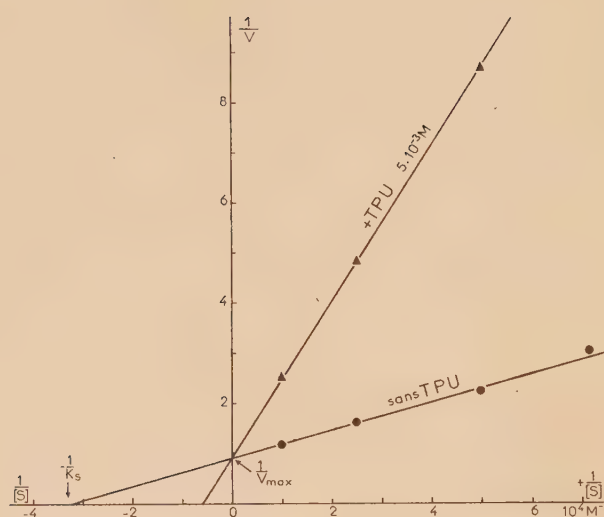


Fig. IV-5

INHIBITION COMPETITIVE DE L'HYDROLYSE DU PPU PAR LE TPU

(COORDONNEES INVERSES)

(L'inverse de la vitesse d'hydrolyse, $1/v$, est exprimé en $(m\mu$ moles de PPU hydrolysé/ $mn/\mu g$ de protéine de la préparation enzymatique) $^{-1}$
 $1/[S]$ = inverse de la concentration de PPU).

TABLEAU IV - 3

CONSTANTES DE DISSOCIATION DE QUELQUES GLUCURONIDES INHIBANT
COMPETITIVEMENT L'HYDROLYSE DU PPU PAR LA GLUCURONIDASE

NOM	K_i
Méthyl- β -D-thioglucuronide	$5,7 \cdot 10^{-2}M$ *
Ethyl- β -D-thioglucuronide	$1,3 \cdot 10^{-2}M$ *
Propyl- β -D-thioglucuronide	$(4,7 \pm 0,6) \cdot 10^{-3}M$
Phényl- β -D-thioglucuronide	$(1,07 \pm 0,20) \cdot 10^{-3}M$
Acide aldobiouronique (galactosyl- β -D-glucuronide)	// $10^{-3}M$ **
Méthyl- β -D-glucuronide, amide.	// $10^{-2}M$ **

* Détermination unique (enzyme purifié)

** Ordre de grandeur (extrait brut).

TABLEAU IV- 4

CLASSEMENT DE DIVERS GLUCURONIDES PAR ORDRE D'AFFINITE
DECROISSANTE POUR LA GLUCURONIDASE

NOM	Affinité relative
Phénolphtaléine- β -D-glucuronide	1 000
Phényl- β -D-thioglucuronide	28
Acide aldobiouronique	*)
Propyl- β -D-thioglucuronide	6,5
Ethyl- β -D-thioglucuronide	2,4
Méthyl- β -D-glucuronide, amide	*)
Méthyl- β -D-glucuronide	0,8
Méthyl- β -D-thioglucuronide	0,6

*) Place approximative, selon l'ordre de grandeur du Ki déterminé

Dans le tableau 4 nous avons classé les divers glucuronides étudiés par ordre d'affinité décroissante pour la β -glucuronidase d'E. coli (en assimilant la constante d'affinité à l'inverse de la constante K_S ou K_i). On voit que le PPU possède de très loin la plus forte affinité pour la β -glucuronidase d'E. coli. Nous pouvons constater d'autre part qu'en règle générale, plus l'aglycone est petit et plus l'affinité est faible (les glucuronides à aglycone méthyle ont une affinité du même ordre de grandeur). Des résultats tout à fait analogues ont été trouvés avec les thiogalactosides et la β -galactosidase d'E. coli (BUTTIN 1955) et avec les β -glucosides et la β -glucosidase de levure (DUERKSEN et HALVORSON 1958). Il semble que plus l'aglycone est hydrophobe, plus son affinité pour l'enzyme est grande (tableau 5 et 6).

En conclusion, cette étude fait ressortir l'étroite stéréospécificité manifestée par la glucuronidase d'E. coli vis-à-vis des substances capables de la complexer. Seuls les glycosides à structure glucuronyle intacte (avec un pont osidique d'O ou de S, peu importe) sont doués d'affinité pour l'enzyme. Le simple remplacement du groupe acide en 6 par une fonction alcool primaire (glucoside), cette même transformation alliée à l'inversion d'un oxhydryle dans l'espace (galactoside) ou la disparition du carbone en 6 (xyloside) entraîne la disparition du pouvoir complexant.

4 - CONCLUSIONS

La β -glucuronidase extraite des cellules d'E. coli a été purifiée 10 à 15 fois par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium et double chromatographie sur DEAE-cellulose. L'allure du pic d'élution de l'enzyme après la première chromatographie et l'absence de variation de ses caractéristiques après la deuxième chromatographie permet de conclure au haut degré de pureté de la préparation obtenue.

TABLEAU IV - 5

AFFINITE DES β -THIOGALACTOSIDES POUR LA β -GALACTOSIDASE
d'E. COLI

(Tiré de BUTTIN 1955)

NOM	Affinité relative
Phényléthyl-thiogalactoside	1 000
Benzyl-thiogalactoside	368
Hexyl-thiogalactoside	32
Butyl-thiogalactoside	16
Propyl-thiogalactoside	11,5
Méthyl-thiogalactoside	0,7
Thiodigalactoside	0,8

TABLEAU IV - 6

AFFINITE DES β -GLUCOSIDES POUR LA β -GLUCOSIDASE DE LEVURE

(tiré de DUERKSEN et HALVORSON 1958)

NOM	Affinité relative
Décyl-glucoside	1 000
Ethoxyphényl-thioglucoside	87,5
Méthylphényl-thioglucoside	48,5
Phényl-thioglucoside	13,8
Allyl-glucoside	1,4
Méthyl-glucoside	1,1
Cellobiose	0,4

La β -glucuronidase d'E. coli est un enzyme très stable, dépourvu de coenzyme ; nous ne lui avons pas trouvé d'ions effecteurs positifs. Il est activé par la présence de substances protectrices de groupements sulfhydryles. Son pH optimum est situé à 7,0 - 7,1 (PPU, tampon véronal-acétate à 38°C) avec un maximum assez étalé de part et d'autre de cette valeur. Cet enzyme catalyse l'hydrolyse des glucuronides, et son affinité pour le PPU en particulier est élevée ($K_S = 3,12 \cdot 10^{-5} M$ à 38°C et en tampon phosphate $2 \cdot 10^{-2} M$ à pH 7,1). Enfin la spécificité du pouvoir complexant des glycosides vis-à-vis de la glucuronidase est très étroite, car seuls ceux qui possèdent la configuration glucuronyle intacte manifestent de l'affinité pour lui.

Ces propriétés sont analogues à celles que l'on a décrites pour la glucuronidase de divers microorganismes, mais elles se distinguent parfois de celles de l'enzyme des animaux supérieurs (voir LEVY et MARSH, 1959 et 1960). Ainsi le pH optimum d'hydrolyse du PPU par la glucuronidase provenant d'E. coli, de Streptococcus et des microorganismes du rumen de mouton oscille généralement aux environs de 6,5 à 7,0 ; au contraire, en ce qui concerne les organismes supérieurs (mollusques, insectes, mammifères), il varie entre 3,5 et 5,0 avec parfois deux valeurs optimum distinctes. L'inhibition par les cations lourds (Cu^{++} en particulier) et l'action protectrice des agents chélateurs et sulfhydrylés a également été signalée, en particulier pour l'enzyme d'E. coli ; celui-ci est inhibé par le p-chloromercuribenzoate et cette inhibition est réversible en présence de cystéine. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse de la présence de groupes sulfhydryles dans la molécule enzymatique. Les glucuronidases de source variée hydrolysent généralement tous les β -glucuronides et aussi dans certains cas les β -galacturonides, mais pas les β -glucosides ni les α -glucuronides. La valeur du K_S pour le PPU varie assez largement (de $2 \cdot 10^{-3}$ à $2 \cdot 10^{-5} M$) selon la provenance de l'enzyme et aussi, pour une même provenance, selon le degré de purification de la préparation, à l'encontre de ce que nous avons constaté dans notre cas. L'inhibition de la vitesse d'hydrolyse par un excès de substrat a également été signalée,

entre autre avec la glucuronidase des mammifères. Enfin, la preuve que la glucuronidase de diverses sources catalyse réellement une hydrolyse a été administrée par la mise en évidence chimique ou chromatographique de l'aglycone et de l'acide glucuronique libérés.

Rappelons pour terminer que nous avons établi l'identité des constantes cinétiques (K_S de FPU et K_i du propyl- et du phénylthioglucuronide) de la glucuronidase de la souche ML 30 al constitutive et de celle de la souche ML30 induite. Ceci est une forte présomption en faveur de l'identité de structure de ces deux types d'enzymes. Nous verrons au chapitre VI les conclusions que l'on peut tirer de cette observation quant au mécanisme de la biosynthèse de la glucuronidase.

°

° °

CHAPITRE V

ETUDE DE LA GLUCURONIDE-PERMEASE D'ESCHERICHIA COLI

1.- INTRODUCTION -

LES PERMEASES DES MICROORGANISMES

Le phénomène de la pénétration sélective de certaines molécules dans diverses cellules animales, de leur concentration ou de leur excrétion par des tissus donnés, a depuis longtemps attiré l'attention des biologistes et fait l'objet d'études détaillées (voir WILLBRANDT 1954, LE FEVRE 1954, DANIELLI 1952). Chez les microorganismes par contre, et bien que l'importance théorique de ce genre de phénomène n'échappât à personne (voir en particulier DOUDOROFF 1951 et DAVIS 1956), on n'avait pas réussi à le mettre en évidence de façon indiscutable. Les travaux récents de MONOD, COHEN et leurs collaborateurs sur les perméases (voir COHEN et MONOD 1957) ont cependant entièrement renversé la situation.

Etudiant la pénétration intracellulaire d'un inducteur de la galactosidase non métabolisé ni attaqué par E. coli, le méthyl- β -D-thiogalactoside (marqué au ^{35}S) les auteurs (COHEN et RICKENBERG 1955^a, MONOD 1956, RICKENBERG, COHEN, BUTTIN et MONOD 1956) constatèrent, à partir de 1955, que ce corps est accumulé par les cellules bactériennes à une concentration bien supérieure à celle du milieu externe. Cette accumulation est réversible, et le niveau interne atteint à l'équilibre varie en fonction de la concentration externe selon une isotherme d'adsorption de LANGMUIR. L'accumulation est tributaire des réactions donatrices d'énergie et elle est spécifiquement et compétitivement inhibée par les galactosides.

et leurs proches analogues stériques, à l'exclusion des autres glucides de structure voisine. Il s'est enfin avéré que cette faculté de concentrer les galactosides à l'intérieur des cellules était inductible selon une cinétique caractéristique de la biosynthèse de nombreux enzymes et que sa formation était inhibée par les agents bloquant spécifiquement la synthèse des protéines. L'individualité de ce système est bien établie, et il apparaît, entre autre, bien distinct de la galactosidase elle-même. L'intervention d'accepteurs intracellulaires stoechiométriques a pu être exclue ; seule l'hypothèse d'un mécanisme de transport catalytique à travers une barrière cellulaire osmotique, normalement imperméable aux galactosides, permet une interprétation correcte des faits observés (RICKENBERG, COHEN, BUTTIN et MONOD 1956, KEPES et MONOD 1957, SISTROM 1958, KEPES 1960). Les auteurs ont proposé d'appeler "galactoside-perméase" le constituant spécifique de ce système, pour illustrer à la fois sa spécificité fonctionnelle et son analogie étroite avec un système enzymatique typique.

Simultanément, furent découvertes (COHEN et RICKENBERG 1955^b et 1956) les aminoacides-perméases, responsables de la concentration spécifique et réversible de divers acides aminés dans les cellules d'E. coli. Ces systèmes sont comparables à la galactoside-perméase. D'autres systèmes spécifiques et bien individualisés, répondant à la définition et aux caractéristiques des perméases, furent ensuite successivement mis en évidence : la glucoside-perméase (MONOD, HALVORSON et JACOB 1957), la glucuronide-perméase (STOEBER 1957), la galactose-perméase (HORECKER, THOMAS et MONOD 1959) et la maltose-perméase (WIESMEYER et COHN 1960) chez E. coli ; l' α -glucoside-perméase chez la levure (ROBERTSON et HALVORSON 1957).

De nombreux autres faits militent en faveur de l'existence de facteurs de perméation à spécificité souvent étroite, et bien que ces systèmes n'aient pas encore été étudiés de manière approfondie, il semble probable qu'on ait, ici encore, affaire à des perméases bien individualisées. Ainsi chez Pseudomonas (KOGUT et coll. 1953, BARETT et coll. 1953,

CLARKE et coll. 1959), chez Aerobacter (DAVIS 1956) et chez Mycobacterium (ELLARD et CLARKE 1959), l'entrée des principaux substrats du cycle de Krebs semble commandée par des facteurs de perméation spécialisés et inductibles, liés à la synthèse des protéines et distincts des enzymes proprement dits catalysant ce cycle. Chez Pseudomonas (SHILO et STANIER 1957), la pénétration des différents isomères de l'acide tartrique à l'intérieur de la cellule dépend également de systèmes spécifiques pour chaque isomère, inductibles et distincts des enzymes responsables de leur attaque métabolique. Enfin, l'entrée du ribose et de son dérivé phosphorylé dans les cellules d'E. coli est gouverné par un facteur spécifique et inductible (EGGLESTON et KREBS 1959). D'autres phénomènes de transport actif et d'accumulation intracellulaire de petites molécules à l'état libre ont été signalés chez divers microorganismes : Streptococcus (GALE 1947), Staphylococcus (GALE 1954), Micrococcus (BRITT et GERHARDT 1958), Saccharomyces (HALVORSON, FRY et SCHWEMMIN 1955 ; HALVORSON et COHEN 1958 ; KALCKAR et DE ROBICHON-SZULMAJSTER 1959 ; DE ROBICHON-SZULMAJSTER 1960 ; BURGER, HEJMOVA et KLEINZELLER 1959), E. coli (LUBIN et KESSEL 1960) ; mais l'existence de facteurs stéréospécifiques comparables aux perméases d'E. coli est ici moins certaine.

La découverte des perméases permet d'interpréter de nombreuses observations paradoxales concernant la physiologie des microorganismes. On connaissait par exemple l'existence de mutants ou de phénotypes "cryptiques" pour un métabolite donné, c'est-à-dire incapables de l'utiliser in vivo, bien que possédant les enzymes nécessaires : par exemple mutants cryptiques pour le lactose (RICKENBERG, COHEN, BUTTIN et MONOD 1956) ou le glucose (voir COHEN et MONOD 1957) chez E. coli, phénotypes cryptiques pour les substrats du cycle de Krebs (KOGUT et PODOSKI 1953 ; CLARKE et MEADOW 1959) ou les tartrates (SHILO et STANIER 1957) chez Pseudomonas. On put établir que ces mutants ou phénotypes étaient dépourvus de la perméase correspondante et par conséquent imperméables à ces métabolites. L'absence de perméase concentrant l'inducteur dans les cellules explique aussi la haute dose d'inducteur nécessaire pour déclencher la biosynthèse enzymatique chez les mutants génotypiquement cryptiques (MONOD 1956).

L'effet de préinduction, par contre, est dû au phénomène inverse. Les bactéries préalablement induites pour un enzyme donné deviennent ultérieurement sensibles à des doses d'inducteur infiniment plus faibles que les bactéries non induites ; en effet, grâce à la perméase préinduite, l'inducteur exogène est concentré activement à l'intérieur des cellules (MONOD 1956). Enfin de nombreuses différences entre les activités d'un enzyme vis-à-vis d'un substrat et celles d'un inhibiteur compétitif sur un enzyme in vitro et in vivo sont imputables à l'action des perméases commandant la pénétration plus ou moins rapide de ces substrats ou inhibiteurs dans la cellule (voir COHEN et MONOD 1957).

Devant l'importance des observations accumulées on peut donc, avec COHEN et MONOD (1957), admettre de manière très générale l'existence d'une barrière cellulaire osmotique chez les microorganismes, barrière essentiellement imperméable aux substances organiques polaires (glucides, acides organiques, amino-acides, etc ...) L'entrée de ces substrats est catalysée par des perméases stéréospécifiques pour chacun d'entre eux. Les incidences fonctionnelles de ces systèmes sur le métabolisme cellulaire sont nombreuses et souvent décisives. Car ce sont eux qui contrôlent le point de départ de nombreuses séquences biochimiques en sélectionnant les substrats exogènes, et accroissent l'efficacité de celles-ci en élevant la concentration intracellulaire du métabolite initial. Souvent même ces perméases commandent la synthèse des enzymes impliqués en agissant sur la pénétration de leur inducteur dans les cellules.

Ainsi que nous l'avons déjà mentionné, il existe chez E. coli un système de perméation spécifique des glucuronides et c'est à l'étude expérimentale de ce système que nous voulons consacrer ce chapitre.

2. - MATERIEL ET TECHNIQUES UTILISES POUR L'ETUDE DE LA GLUCURONIDE - PERMEASE

Substrat

Nous avons synthétisé et utilisé dans ce but le phényl- β -D-thio-glucuronide (TPU) marqué au ^{35}S (voir chap. III). Ce corps, bien qu'ayant

de l'affinité pour la β -glucuronidase d'E. coli, n'est pas hydrolysé par elle, ni métabolisé, incorporé ou transformé de façon décelable par cet organisme (voir chap. VI). Il est donc aisé de suivre son accumulation intracellulaire.

Autres produits

Pour les autres glucuronides voir au chap. III.

Les thiogalactosides (TURK 1955 ; HELFERICH et TURK 1956) et le phényl- β -D-thioglucoside (FISCHER et DELBRUCK 1909) ont été synthétisés au laboratoire.

Les autres produits étaient commerciaux.

Souches

Sauf indication contraire, nous avons utilisé la souche ML30 d'Escherichia coli, isolée au laboratoire (MONOD et AUDUREAU 1946). Nous avons aussi employé dans certains cas des mutants de la souche K12 d'E. coli provenant de M.J. LEDERBERG (Madison, U.S.A.).

Conditions de croissance et d'expérimentation type

Les cultures étaient ensemencées en milieu synthétique liquide tamponné à pH 7 (milieu salin "63", voir SISTROM 1958), additionné de succinate (5 mg/ml) comme source d'énergie et, le cas échéant, d'un glucuronide inducteur. Elles étaient agitées en fioles coniques dans un bain-marie à 34°C. Pour les expériences d'accumulation nous utilisions toujours des cellules en voie de croissance exponentielle, centrifugées à + 4°C, lavées par centrifugation dans le milieu 63 et remises en suspension dans une quantité de milieu 63 calculée pour avoir une concentration cellulaire de l'ordre de 250 μ g de poids sec/ml (la concentration bactérienne était déterminée par lecture de l'absorption à 600 m μ sur un spectrophotomètre préalablement étalonné). Après une agitation de 15 mn à 34°C une portion adéquate de cette suspension était additionnée de chloromycétine (concentration finale 50 μ g/ml*), puis de TPU³⁵S de concentration et radioactivité connue. Après une incubation (agitation douce en bain-marie

* Dose suffisante pour inhiber une nouvelle formation de perméase.

à 34°C) de temps variable il était procédé à la mesure de l'accumulation intracellulaire du TPU selon l'une des deux techniques suivantes :

a) Technique de centrifugation

Un prélèvement de 5 ml était refroidi 5 minutes à 0°C, puis centrifugé à 15 000 g pendant 10 mn à 0°C. Le surnageant était éliminé par aspiration rapide, les parois du tube soigneusement essuyées jusqu'au voisinage immédiat du culot et celui-ci remis en suspension dans 1,5 ml d'eau distillée. Une portion aliquote de cette suspension était étalée et séchée en couche infiniment mince et sa radioactivité mesurée dans un compteur Geiger-Müller (1000 impulsions comptées chaque fois sur 2 à 4 échantillons identiques, selon la précision recherchée).

b) Technique de filtration

Un prélèvement correspondant à 200-250 μ g de poids sec était filtré sous vide (2 à 3 secondes) sur filtre Millipore type HA^{*}, lavé sur filtre par 2 fois 4 ml de milieu 63 à 0°C. Les filtres étaient séchés et leur radioactivité mesurée directement comme ci-dessus.

La technique de centrifugation, où le temps du prélèvement est moins bien défini, n'a été pratiquement utilisée que pour les expériences qualitatives. Des contrôles appropriés ont montré que les deux techniques donnaient des valeurs similaires et reproductibles, bien qu'un peu supérieures par la technique de centrifugation.

La "contamination passive" résultant de la rétention passive de la radioactivité du milieu extérieur par les cellules et par le tube de centrifugation ou le filtre, était déterminée dans chaque cas à l'aide d'un témoin approprié (suspension bactérienne non induite et inhibée par l'azoture (voir plus loin)). Il en résulte que dans le cas de la centrifugation il faut tabler sur une contamination passive de 0,8 μ l et dans le cas de la filtration de 0,4 μ l pour un poids sec bactérien de l'ordre de 250 μ g ;

* -Millipore Corporation, Waltham/Massachusetts, USA.

tous nos résultats sont donc corrigés de façon systématique pour éliminer l'effet de la contamination passive.

3. MISE EN EVIDENCE DE L'ACCUMULATION INTRACELLULAIRE DE TPU

CARACTERISTIQUES GENERALES DU PHENOMENE

En examinant le tableau 1 on voit que les bactéries préalablement induites (c'est-à-dire ayant effectué leur croissance en présence de méthyl- β -D-glucuronide (MU)), puis incubées 15 mn en présence de TPU³⁵S 10^{-3} M, retiennent une radioactivité importante, correspondant à 50μ moles de ce substrat accumulé par g de poids sec bactérien (la radioactivité correspondante ne change pas, même après plusieurs lavages du filtre millipore). Cette quantité, toujours du même ordre de grandeur dans les mêmes conditions, peut cependant varier, selon l'état physiologique des bactéries, dans les proportions de 20-30 % environ. Le TPU accumulé correspond à plus de 1 % du poids sec bactérien * (si l'on admet pour les bactéries une densité de 1 et une hydratation de 75 %) représente une concentration intracellulaire de substrat plus de 10 fois supérieure à celle du milieu extérieur. Ce facteur de concentration, de plus en plus prononcé au fur et à mesure qu'on abaisse la concentration externe de TPU, peut atteindre près de 200 fois cette concentration externe (Tableau 2). L'accumulation intracellulaire de TPU est inhibée de 70 % par l'azoture de sodium ; ceci indique que le mécanisme responsable de cette accumulation est largement dépendant des réactions génératrices d'énergie métabolique.

Ce système est inactif chez les bactéries non induites : en effet la faible radioactivité entraînée par leurs cellules n'est pas diminuée par la présence d'azoture de sodium. Il s'agit donc dans ce cas d'une simple rétention passive ("contamination passive") due à la pellicule liquide qui adhère encore au matériel servant à l'isolement des cellules (tubes à

* Dans certains cas elle peut même atteindre près de 2 % du poids sec bactérien.

TABLEAU V- 1

ACCUMULATION DE TPU³⁵S par les BACTERIES (Radioactivité

du TPU : 34.960 impulsions/mn/ μ moles, soit environ 0,44 μ C/ μ mole)

Etat de la suspension bactérienne et additions éventuelles au moment de l'expérience d'accumulation.	Impulsions/mn pour 250 μ g de poids sec bactérien.		TPU ³⁵ S accumulé dans les cellules bactériennes*			
	mesurées	corrigées**	% du poids sec bactérien	moles TPU $\times 10^{-1}$ poids sec bactérien.	valeurs relatives	facteur de concentration par rapport au milieu externe.
Préalablement non induite	26	0	0	0	0%	-
Préalablement non induite ; +N ₃ Na 2.10 ⁻² M	25	0	0	0	0%	-
Préalablement induite (MU*** 5.10 ⁻³ M)	464	436	1,4	50	100%	12,5x
Préalablement induite (MU 5.10 ⁻³ M) ; + N ₃ Na 2.10 ⁻² M	157	129	0,43	15	30%	3,7x

* -Après un temps d'incubation de 15 mn en présence de TPU³⁵S 10⁻³M

** -Correction de 0,8 μ l, soit 28 impulsions/mn pour TPU³⁵S 10⁻³M

*** -MU = Méthyl- β -D-glucuronide

TABLEAU V - 2

COMPARAISON DE LA CONCENTRATION DU TPU ACCUMULE DANS LES
CELLULES ET DE LA CONCENTRATION DU TPU EXTERNE

Concentration externe de TPU ($10^{-3}M$)	μ moles TPU accumulées par g de poids sec bactérien	Facteur de concentra- tion par rapport au milieu extérieur
1	41,1	10 x
0,094	27,3	73 x
0,0043	3,4	196 x

Incubation de la suspension bactérienne : 15 minutes à 34°C.

Suspension provenant d'une culture induite par MU 10^{-3} M.

centrifuger, filtres millipore) et surtout aux cellules elles-mêmes : cette contamination passive est en effet proportionnelle à la masse cellulaire, et aussi à la radioactivité ambiante.

La quantité de TPU accumulée par les bactéries induites par unité de volume est proportionnelle à la concentration des cellules (pourvu que la concentration du TPU dans le milieu extérieur demeure constante) (fig. 1).

Ainsi que nous le verrons ultérieurement (chap. VI p. 126) la radioactivité accumulée dans les cellules est entièrement extraite par l'eau bouillante, et le TPU accumulé n'est ni hydrolysé ni modifié de manière décelable par les bactéries. On en conclut qu'il existe chez les bactéries, préalablement induites par un glucuronide, un système capable de prélever le TPU du milieu externe et de l'accumuler sans transformation chimique à l'intérieur des cellules.

Les études sur l'accumulation intracellulaire du TPU en fonction du temps montrent que sa pénétration est progressive et très rapide, et qu'on atteint en 5 minutes environ un niveau intracellulaire stable pendant plus de 30 minutes à 34°C (fig. 2). A 0°C le niveau interne atteint à l'équilibre est bien inférieur et, d'autre part, l'équilibre est réalisé en moins de 2 minutes dans ce cas (fig. 3).

Nous avons éprouvé l'influence de divers cations sur l'accumulation intracellulaire du TPU (Tableau 3). L'ion Mg^{++} exerce un léger effet activateur, les ions Zn^{++} , Cu^{++} , et Co^{++} sont nettement inhibiteurs et le complexon (éthylènediaminetétraacétate de sodium, puissant complexant de nombreux cations) présente un léger pouvoir inhibiteur ; les autres ions sont sans effet.

Mentionnons enfin que l'accumulation intracellulaire du TPU est inhibée par le p-chloromercuribenzoate $10^{-3}M$ (concentration externe de TPU $10^{-3}M$, à 34°C) selon une cinétique exponentielle en fonction du temps, mais sans effet protecteur du substrat (TPU). Il semble donc probable que le

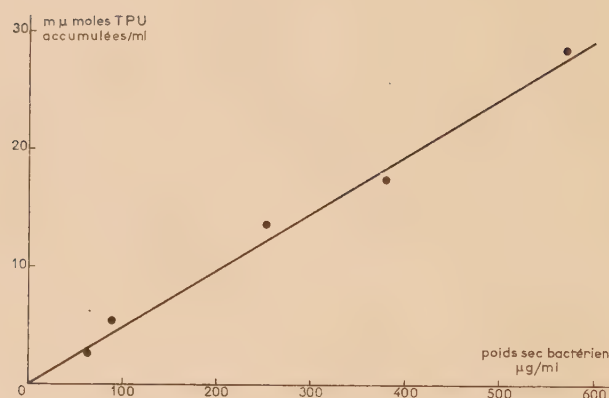


Fig. V - 1

ACCUMULATION INTRACELLULAIRE DE TPU PAR UNITE DE VOLUME
A L'EQUILIBRE, EN FONCTION DE LA CONCENTRATION BACTERIENNE (34°C ;
TPU externe $10^{-3}M$)

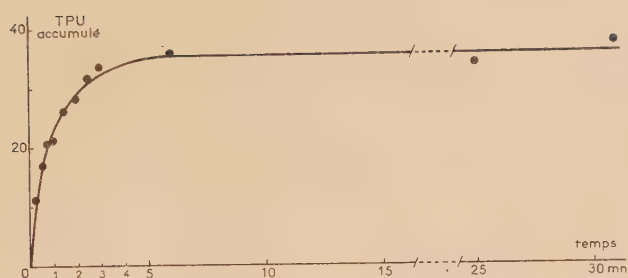


Fig. V - 2

CINETIQUE DE L'ACCUMULATION INTRACELLULAIRE DE TPU

(34°C ; TPU externe $10^{-3}M$)

(Le TPU accumulé, ainsi que sur toutes les figures suivantes ,
est exprimé en μ moles accumulées par g de poids sec bactérien)

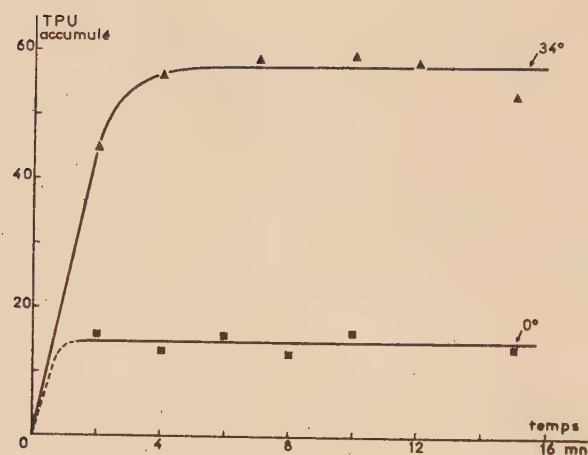


Fig. V - 3

INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR L'ACCUMULATION INTRACELLULAIRE
de TPU

(TPU externe 10^{-3} M)

TABLEAU V-3

INFLUENCE DES CATIONS ET DU COMPLEXON (EDTA) SUR L'ACCUMULATION INTRA-CELLULAIRE DU TPU

Ion ajouté (concentration finale 10^{-2} ion-gramme/litre)	μ moles TPU accumulé par g poids sec bac- térien	Valeurs relatives
Contrôle sans ion	36	100
Na ⁺	36	100
K ⁺	36	100
Mg ⁺⁺	43	120
Ca ⁺⁺	34	95
Mn ⁺⁺	35	97
Zn ⁺⁺	10	28
Cu ⁺⁺	0	0
Co ⁺⁺	16	44
EDTA*	29	80

* Ethylènediaminetétraacétate (sel disodique, dihydrate = Complexon III)

Milieu de culture et d'expérience : "milieu Tris" appauvri au maximum en ions minéraux et tamponné au Tris (=Tris(-hydroxyméthyl-) amino-méthane) à pH 7,5 : Tris : 0,1M ; ClNH_4 : 0,02M ; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$: 0,001M ; $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,001 M ; Cl_3Fe : 0, 00001 M.

Temps d'incubation : 30 minutes, en présence de TPU^{35}S 10^{-3}M final à 34°C.

Contrôles de contamination passive effectués en présence de chaque ion (pas d'effet significatif).

système accumulateur comporte au moins un constituant à groupement sulfhydryle inactivable. Toutefois, les protecteurs de groupements $-SH$, tels que le β -mércaptoacétate ou le β -mércaptoéthanol ($10^{-3}M$) sont sans influence sur l'accumulation du TPU dans les cellules.

4 - REVERSIBILITE, EQUILIBRE, SATURATION DE L'ACCUMULATION

L'accumulation du TPU dans les cellules est un phénomène réversible ainsi que le révèle l'expérience décrite dans le tableau 4.

Nous constatons que le TPU³⁵S ayant pénétré dans les cellules en est totalement chassé par addition de TPU non radioactif, ajouté au milieu externe en concentration 100 fois supérieure. La fig. 4 illustre l'allure de ce phénomène en fonction du temps et souligne l'extrême rapidité aussi bien de la sortie que de l'entrée du TPU.

Les résultats de l'expérience inverse sont concrétisés dans la fig. 5. Une suspension bactérienne préalablement équilibrée à 34°C avec du TPU non radioactif ($10^{-4}M$) est ensuite additionnée d'un faible volume de TPU fortement radioactif à la même concentration ; on suit la pénétration du TPU radioactif dans les cellules (qui ont par conséquent déjà accumulé leur niveau stable en TPU non radioactif). On réalise parallèlement une série de contrôles sur une suspension de même densité cellulaire finale et recevant simultanément le même mélange de TPU radioactif et non radioactif. On constate que la totalité du TPU interne est échangeable avec le TPU externe, les niveaux atteints à l'équilibre étant pratiquement les mêmes. De plus le renouvellement du substrat se fait à la même vitesse que son entrée initiale: la vitesse d'entrée initiale est indépendante de la concentration interne de TPU. A noter dans le cas de l'échange du TPU une légère exaltation transitoire du niveau d'accumulation interne (phénomène reproductible).

Il est donc clair que le TPU intracellulaire s'échange à tout instant avec le TPU exogène. L'existence de cette réversibilité est du reste confirmée par l'instauration graduelle d'un équilibre entre la concentration externe et interne de TPU, telle que la traduisent les fig. 2 et 3.

TABLEAU V - 4

REVERSIBILITE DE L'ACCUMULATION INTRACELLULAIRE DU TPU

Conditions d'incubation de la suspension bactérienne * (34°C)	μmoles TPU ³⁵ S accumulé par g de poids sec bactérien
10 mn en présence de TPU ³⁵ S 5.10 ⁻⁴ M exogène	37
Portion aliquote de la suspension ci-dessus prélevée après 10 mn de contact avec TPU ³⁵ S 5.10 ⁻⁴ M et additionnée de TPU ³² S 5.10 ⁻² M (10 mn de contact)	0
20 mn en présence de TPU ³⁵ S 5.10 ⁻⁴ M	37
10 mn en présence de TPU ³⁵ S 5.10 ⁻⁴ M et de TPU ³² S 5.10 ⁻² M ajoutés simultanément	0

* Suspension provenant d'une culture induite par le MU 10⁻³M.

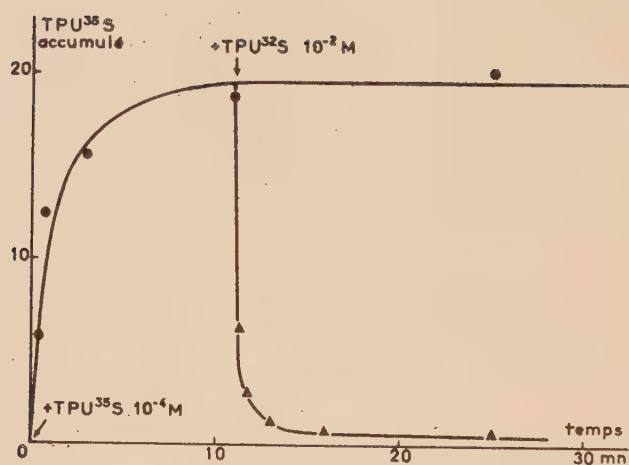


Fig. V - 4

REVERSIBILITE DE L'ACCUMULATION INTRACELLULAIRE DU TPU³⁵S

(34°C)



Suspension témoin sans TPU³²S en excès

Suspension additionnée de TPU³²S en excès

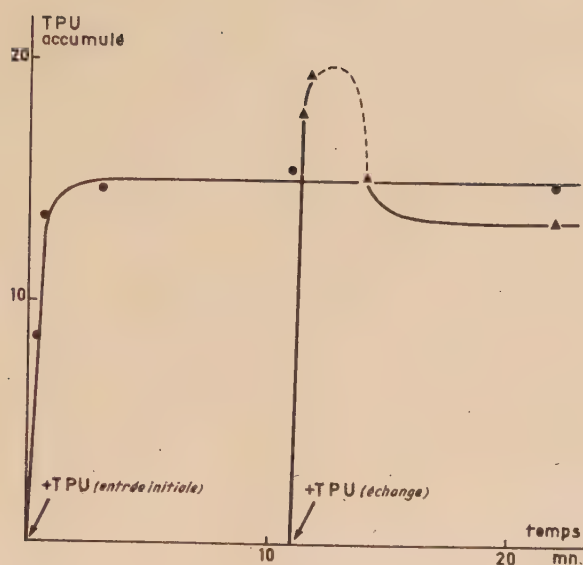


Fig. V - 5

RENOUVELLEMENT DU TPU INTRACELLULAIRE (34° C ;

TPU externe $10^{-4}M$)



TPU³⁵S ajouté dès le début



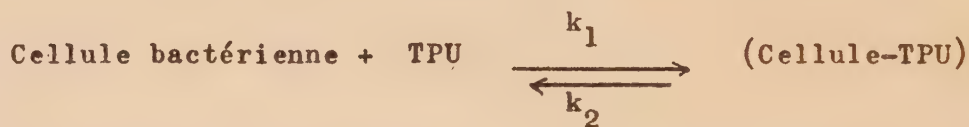
TPU³⁵S ajouté après équilibration préalable
avec TPU³²S.

L'hypothèse la plus vraisemblable est que la variation du niveau interne U_{in} de TPU reflète à tout moment la différence entre la vitesse d'entrée V_{in} et la vitesse de sortie V_{ex} : $\frac{d U_{in}}{dt} = V_{in} - V_{ex}$ (1) et que le niveau d'équilibre U_{in}^{∞} est atteint dt lorsque ces deux vitesses deviennent égales (voir discussion plus loin).

La concentration interne de TPU à l'équilibre, U_{in}^{∞} varie en fonction de la concentration externe de TPU, U_{ex} , conformément à une isotherme d'adsorption de LANGMUIR de la forme :

$$U_{in}^{\infty} = Y \frac{U_{ex}}{U_{ex} + K} \quad (2) \quad (\text{fig. 6 et 7}).$$

où Y et K sont deux constantes pour une suspension bactérienne donnée*. En d'autres termes tout se passe comme si on avait l'équilibre :



$K = \frac{k_2}{k_1}$ représente la constante de dissociation du complexe hypothétique (cellule-TPU) et Y est une constante appelée capacité (RICKENBERG, COHEN, BUTTIN et MONOD 1956). La capacité Y exprime la quantité maximum de TPU que la cellule peut accumuler à l'équilibre lorsque la concentration externe est saturante, c'est-à-dire

$$U_{ex} \gg K \quad \frac{U_{ex}}{U_{ex} + K} \longrightarrow 1 \quad \text{et} \quad U_{in}^{\infty} \longrightarrow Y.$$

La "capacité spécifique" sera définie comme étant la capacité en μ moles de TPU par unité de poids sec bactérien. Soulignons le fait que l'équation (2) constitue une représentation purement empirique du phénomène, qui ne préjuge en rien du mécanisme correspondant. Avant de discuter de ce mécanisme (voir § 7), nous exposerons les résultats de l'étude cinétique et physiologique du système.

* Ceci n'est toutefois valable que dans une zone de concentration déterminée, ainsi qu'on le verra plus loin.

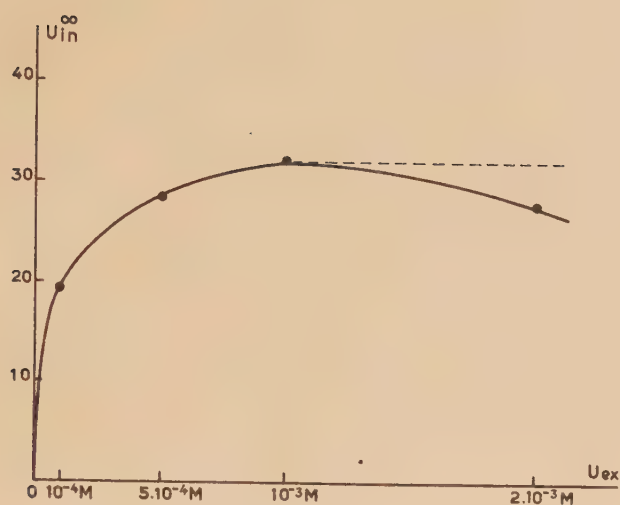


Fig. V - 6

VARIATION DE LA CONCENTRATION INTRACELLULAIRE DE TPU à
L'EQUILIBRE , U_{in}^{∞} , EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EX-
TERNE U_{ex} (34°C)

(U_{in}^{∞} est exprimé en μ moles/g de poids sec bactérien).

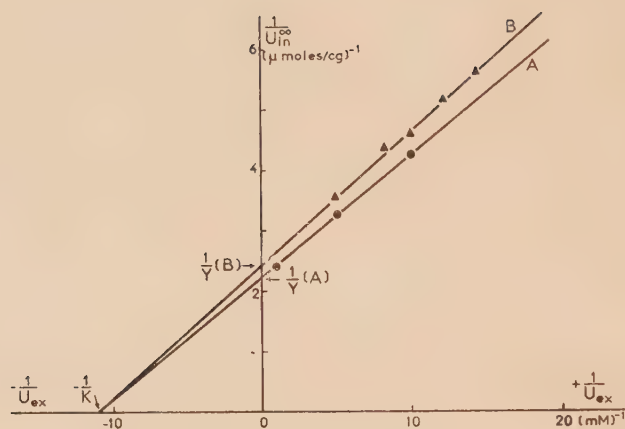


Fig. V - 7

VARIATION DE LA CONCENTRATION INTRACELLULAIRE DE TPU A,
L'EQUILIBRE, U_{in}^{∞} , EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EXTERNE
 U_{ex} (zone $10^{-3}M$ à $5 \cdot 10^{-5}M$) - Coordonnées inverses ($34^{\circ}C$)

La fig. 6 nous montre que vers $U_{ex} = 10^{-3}M$ on a pratiquement atteint la saturation. Il semble cependant que pour les valeurs plus fortes d' U_{ex} ($2.10^{-3}M$) la relation (2) ne soit plus vérifiée, U_{in}^{∞} ayant tendance à diminuer (phénomène qui s'observe également avec certains systèmes enzymatiques comme la β -glucuronidase d'E. coli en particulier (voir chap. IV p.54) et qui résulte généralement de l'inhibition de l'activité enzymatique par le substrat).

Nous avons déterminé les valeurs de Y et K, à 34°C, en appliquant la méthode graphique des coordonnées inverses (fig. 7). Ainsi qu'on peut le constater les valeurs de Y (ordonnée d'abscisse $0 = \frac{1}{Y}$; constante pour une suspension bactérienne donnée) varient sensiblement d'une expérience à l'autre (Expérience A : $Y = 44,5 \mu\text{ moles/g}$. Expérience B : (mêmes conditions que A) $Y = 40,8 \mu\text{ moles/g}$) selon l'état physiologique des bactéries et aussi leur niveau d'induction. La valeur de K, par contre, (abscisse d'ordonnée $0 = -\frac{1}{K}$) est remarquablement constante aux imprécisions près des mesures (droites de la fig. 7 concourantes au point d'intersection avec l'axe des abscisses). Dans une zone de concentration s'étendant de $10^{-3}M$ à $5.10^{-5}M$ environ, K est de l'ordre de $9.10^{-5}M$ (en adoptant un coefficient de sécurité de 95 % on a $K = (9,1 \pm 0,85) \times 10^{-5*}$). Aux concentrations inférieures la valeur de K diminue : ainsi entre $5.10^{-5}M$ et $5.10^{-6}M$ environ la relation (1) est encore vérifiée (fig. 8) mais avec une valeur de K de l'ordre de $4.10^{-5}M$ (valeur moyenne de 3 déterminations: $3,9.10^{-5}M$ avec une erreur standard de $0,6.10^{-5}M$).

Nous avons d'autre part cherché à étudier la variation des vitesses d'entrée V_{in} initiales de TPU dans les cellules en fonction de la concentration exogène de TPU. Ces vitesses V_{in} sont théoriquement données par les pentes à l'origine des courbes $U_{in} = f(t)$ (U_{in} = concentration intracellulaire de TPU et t = temps), telles qu'elles sont représentées dans

* Les variations portant sur ces déterminations reflètent de manière cumulative l'incertitude sur les mesures et la fluctuation au sein des populations bactériennes.

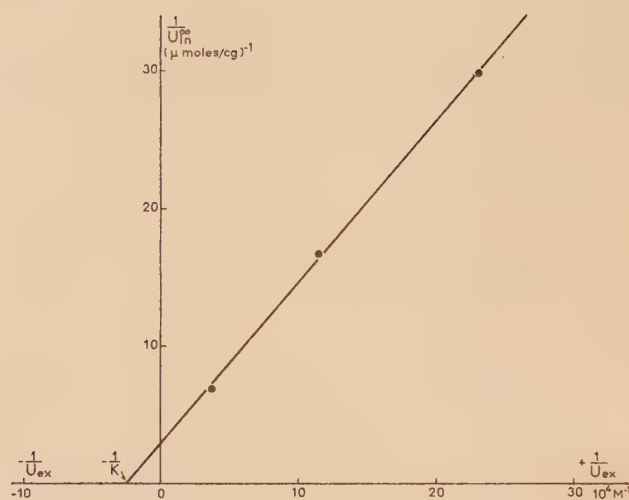


Fig. V - 8

VARIATION DE LA CONCENTRATION INTRACELLULAIRE DE TPU à
L'EQUILIBRE, U_{in}^{∞} , EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EXTERNE
 U_{ex} (zone $5 \cdot 10^{-5} M$ à $5 \cdot 10^{-6} M$) - Coordonnées inverses ($34^{\circ}C$)

les fig. 2 et 4 par exemple, si l'on suppose que dans cette phase initiale la vitesse de sortie du TPU est nulle (relation (1)). Cela revient, techniquement, à mesurer l'accroissement de la concentration interne de TPU, ΔU_{in} , dans la phase initiale pendant un temps Δt aussi petit que possible. Il est difficile de descendre en-dessous d'une minute pour Δt , car l'imprécision sur la mesure du temps devient trop importante (très grande dispersion des mesures au temps $t = 0,25$ ou $0,5$ mn p. ex.). Notons cependant qu'au temps $t = 1$ mn la vitesse d'entrée V_{in} a déjà diminué par rapport à sa valeur initiale, ce qui introduit une erreur systématique par défaut (voir fig. 2 et 4).

A la précision près des mesures on voit (fig. 9 et 10) que la vitesse d'entrée V_{in} initiale du TPU varie en fonction de la concentration externe U_{ex} de TPU également selon une isotherme d'adsorption de la forme $V_{in} = y \frac{U_{ex}}{U_{ex} + K'}$ (3). La saturation est cependant atteinte bien plus rapidement pour les vitesses d'entrée (fig. 9 : saturation pratiquement atteinte à $2 \cdot 10^{-4} M$) que pour le niveau interne à l'équilibre U_{in}^{∞} (fig. 6 : à $2 \cdot 10^{-4} M$ on est loin d'être à saturation). En effet, la valeur de K' déterminée dans une zone de concentration de $10^{-4} M$ à $2 \cdot 10^{-6} M$ environ, est ici de l'ordre de $1,6 \cdot 10^{-5} M$ (on a $K = (1,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-5} M$ avec un coefficient de sécurité de 95 %) c'est-à-dire moins de la moitié de la valeur de K de la relation (2) dans la même zone de concentration (fig. 10). Signalons que y est une constante pour une suspension donnée mais varie selon l'état physiologique de celle-ci de même que la constante Y de la relation (2). Pour une même suspension, y est également différent de Y (à titre d'indication, pour une même suspension, nous avons obtenu $Y = 43 \mu$ moles/g poids sec et $y = 26,5 \mu$ moles/g poids sec/mn).

En conclusion, on constate que la variation de la vitesse d'entrée, V_{in} , en fonction de la concentration externe de TPU suit une loi analogue à celle qui régit la variation de la concentration interne à l'équilibre, U_{in}^{∞} . Il n'y a cependant pas proportionnalité entre ces deux grandeurs dans la région de non-saturation (voir fig. 11).

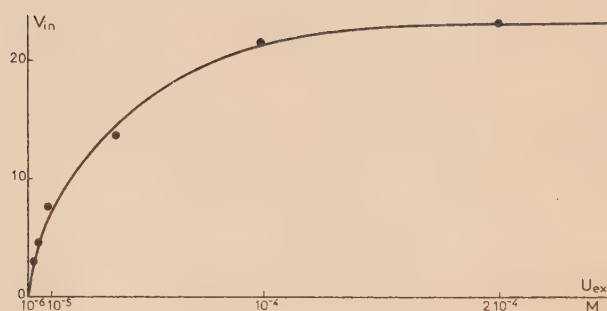


Fig. V - 9

VARIATION DE LA VITESSE D'ENTREE INITIALE V_{in} DU TPU EN
FONCTION DE LA CONCENTRATION EXTERNE U_{ex} DE TPU ($34^{\circ}C$)

(V_{in} est exprimé en μ moles de TPU accumulé par g de poids sec bactérien par minute).

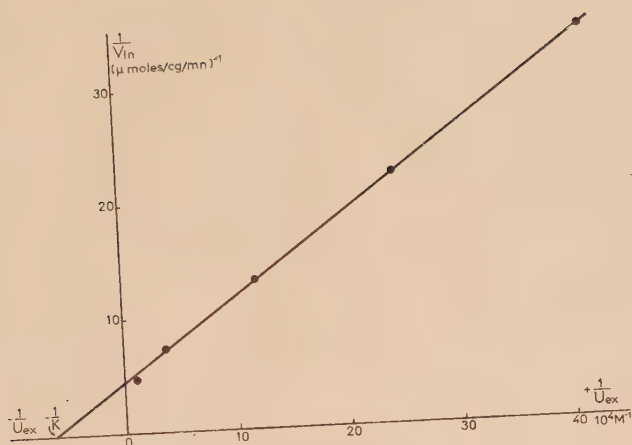


Fig. V - 10

VARIATION DE LA VITESSE D'ENTREE INITIALE DE TPU, V_{in} EN
FONCTION DE LA CONCENTRATION EXTERNE DE TPU, U_{ex} ; COORDONNEES
INVERSES - (34°C)

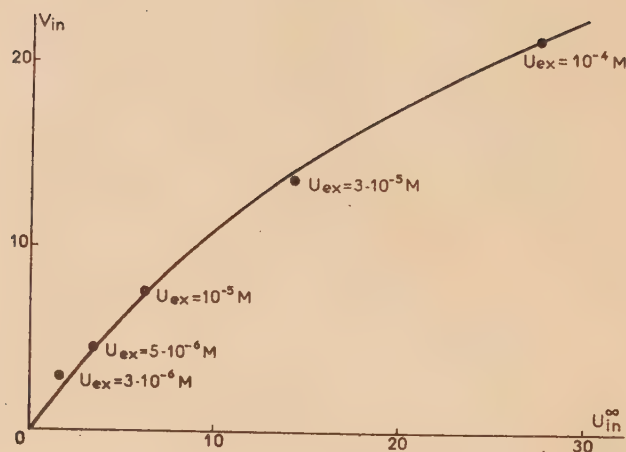


Fig. V - 11

VARIATION DE LA VITESSE D'ENTREE INITIALE DU TPU, V_{in} , EN
FONCTION DE LA CONCENTRATION INTERNE DE TPU ACCUMULE A L'
EQUILIBRE, U_{in}^{∞} (34°C)

(V_{in} est exprimé en μ moles de TPU accumulé par g de poids sec bactérien par minute, et U_{in}^{∞} en moles de TPU accumulé à l'équilibre par g de poids sec bactérien ; U_{ex} = concentration externe de TPU)

5. INDUCTIBILITE DU SYSTEME ACCUMULATEUR DE TPU

Nous avons vu au paragraphe 1 (tableau 1) que le système accumulateur était absent chez les bactéries non induites et qu'on ne pouvait le mettre en évidence que chez celles qui avaient effectué leur croissance en présence d'un glucuronide. Nous avons essayé l'inductibilité de ce système chez Escherichia coli ML30 par deux glucuronides : le phényl- β -D-thiogluconide (TPU) et le méthyl β -D-glucuronide (MU) (tableau 5). Etant donné la variation des capacités spécifiques d'une expérience à l'autre, les chiffres indiqués n'ont qu'une valeur purement qualitative. Ils permettent néanmoins de conclure : 1°) que le système accumulateur de TPU est inducible (activité nulle chez les cellules non induites) ; 2°) que les capacités spécifiques induites varient avec la nature de l'inducteur, à concentration d'inducteur égale (le MU induit environ 3 fois plus que le TPU).

Nous constatons d'autre part qu'un même inducteur induit toujours simultanément le système accumulateur et la β -glucuronidase. On observe pour cette dernière la même loi de variabilité de l'induction en fonction de la nature de l'inducteur ; la différence des pouvoirs inducteurs des TPU et MU est cependant plus accusée pour la glucuronidase que pour le système accumulateur : à concentration égale le MU induit plus de 10 fois mieux la glucuronidase que le TPU, alors que ce rapport n'est que de 3 pour le système accumulateur.

L'augmentation induite de l'activité totale du système accumulant le TPU dans les cellules d'E. coli ML 30 suit une loi linéaire en fonction de l'accroissement de masse bactérienne (fig. 12) ; en d'autres termes la "capacité totale" du système accumulateur de TPU (exprimée en molécules accumulées par unité de volume) croît linéairement en fonction de l'accroissement de masse bactérienne par unité de volume. On sait que cette cinétique est caractéristique de la biosynthèse induite de nombreux enzymes inductibles, synthétisés de novo à partir de leurs éléments constitutifs postérieurement à l'addition de l'inducteur (MONOD, PAPPENHEIMER et COHEN-BAZIRE 1952 ; HOGNESS, COHN et MONOD 1955). Notons cependant que la droite caractéristique de cette fonction ne s'extrapole pas à l'abscisse correspondant à l'addition de l'inducteur.

TABLEAU V- 5

INDUCTIBILITE DU SYSTEME ACCUMULATEUR DE TPU CHEZ E.COLI ML30

Inducteur		TPU ³⁵ S accumulé * μ moles/g poids sec bactérien	β-glucuronidase °° (m μ moles PPU hydro- lysé/mn/g poids sec bactérien)
Nature	Concentration		
Néant	-	0	0
TPU	10 ⁻³ M	11,4	840
MU	10 ⁻³ M	36,4	12100

* Suspensions bactériennes incubées 15 mn à 34°C en présence de TPU³⁵S 10⁻³M exogène. Cette valeur étant saturante, on peut assimiler les quantités accumulées aux capacités spécifiques.

°° Conditions standard définies au chap. IV, p. 43. Suspensions bactériennes traitées au toluène (voir chap. VI, p. 118).

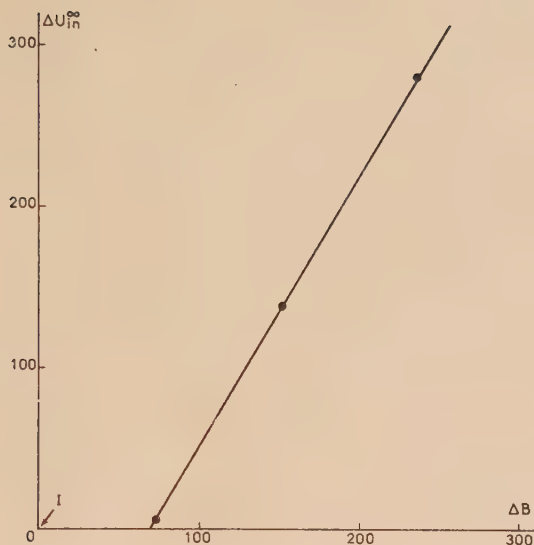


Fig. V - 12

CINETIQUE DE LA BIOSYNTHESE INDUITE DU SYSTEME ACCUMULATEUR
de TPU chez E. coli ML30

(34°C - Mesure du TPU accumulé en présence de TPU $10^{-3}M$ exogène - temps d'incubation : 10 mn).

ΔU_{in}^{∞} = Accroissement de la quantité de TPU accumulé à l'équilibre par unité de volume de la culture ; exprimé en m μ moles de TPU accumulé par 100 ml de suspension bactérienne

ΔB = Accroissement de masse bactérienne ; exprimée en μg de poids sec bactérien par ml de suspension.

I = Addition d'inducteur ($MU 10^{-3}M$)

L'induction de ce système accumulateur est bloquée par la chloromycétine (fig. 13 et tableau 6), dont on sait que tout en arrêtant la synthèse des protéines, elle permet celle des acides nucléiques ainsi que le fonctionnement du métabolisme énergétique (croissance résiduelle visible sur la fig. 13). La biosynthèse du système est également supprimée par la β -2-thiénylalanine (fig. 14 et tableau 7) ; cet analogue d'acide aminé, sans inhiber la synthèse des protéines, inactive certaines protéines (enzymes) dans lesquelles il est incorporé (MUNIER et COHEN 1956 et 1959 ; COHEN et MUNIER 1959) (voir fig. 14, croissance résiduelle linéaire des bactéries en présence de thiénylalanine). Il ne fait donc pas de doute que la formation du système accumulateur de TPU est liée à la synthèse des protéines, et il apparaît probable qu'au moins l'un des éléments constituant ce système soit effectivement une protéine, synthétisée de novo lorsqu'on ajoute un inducteur approprié.

6 - SPECIFICITE D'INDUCTION ET DE FONCTIONNEMENT DU SYSTEME ACCUMULATEUR DE TPU

L'accumulation du TPU dans les cellules d'E. coli ML30 est inhibée spécifiquement par les glucuronides vrais et les thioglucuronides, ainsi que le révèle l'examen du tableau 8.

On voit que les glycosides même voisins, comme les glucosides, sont incapables d'inhiber cette accumulation. Bien plus, les glucuronides dont le groupement acide (en 6) est bloqué, soit par une fonction ester, soit par une fonction amide, sont également dénués de pouvoir inhibiteur, de même que le radical glucuronyl non engagé dans une combinaison osidique (acide glucuronique). La spécificité de fonctionnement du système accumulateur s'avère donc très étroite sur le plan stérique puisque seuls les glucuronosides à radical glucuronyl intact sont capables d'interférer avec le TPU pour l'accumulation. Cette inhibition suit les lois classiques de l'inhibition compétitive des enzymes pour les trois glucuronides

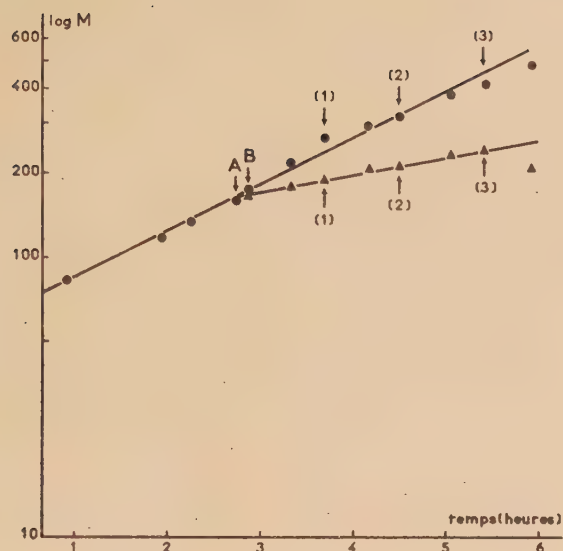


Fig. V - 13

BIOSYNTHESE INDUITE DU SYSTEME ACCUMULATEUR DE TPU ; CROISSANCE
DES SUSPENSIONS BACTERIENNES EN PRESENCE ET EN L'ABSENCE DE
CHLOROMYCETINE.

—●—●—●— Suspension sans chloromycétine

—▲—▲—▲— Suspension avec chloromycétine

M = masse bactérienne/unité de volume (exprimée en coordonnées spectrophotométriques arbitraires)

1, 2, 3, : n° des prises

A : addition de chloromycétine ($50 \mu\text{g/ml}$)

B : addition d'inducteur ($MU 10^{-3}M$)

TABLEAU V-6

BIOSYNTHESE INDUITE DU SYSTEME ACCUMULATEUR DE TPU EN PRESENCE
ET EN L'ABSENCE DE CHLOROMYCETINE (complément de
la figure 13)

N° de la prise	Suspension bactérienne*	Accroissement de poids sec bactérien ($\mu\text{g/ml}$) à partir de l'addition d'inducteur	TPU accumulé dans les cellules : $m\mu\text{moles/100 ml suspension}$ = "capacité totale" **
1	sans chloro-mycétine	76	5
	avec chloro-mycétine	21	0
2	sans chloro-mycétine	152	138
	avec chloro-mycétine	43	0
3	sans chloro-mycétine	235	281
	avec chloro-mycétine	72	0

* Culture en voie de croissance exponentielle, divisée en 2 lots dont l'un reçoit de la chloromycétine ($50 \mu\text{g/ml}$). L'inducteur ($\text{MU } 10^{-3}\text{M}$) est ajouté 5 minutes après dans les deux cultures (source d'énergie : succinate ; température d'agitation des cultures : 34°C).

** Le TPU accumulé est mesuré dans les conditions usuelles : incubation de la suspension bactérienne à 34°C , en présence de TPU 10^{-3}M exogène, pendant 10 minutes.

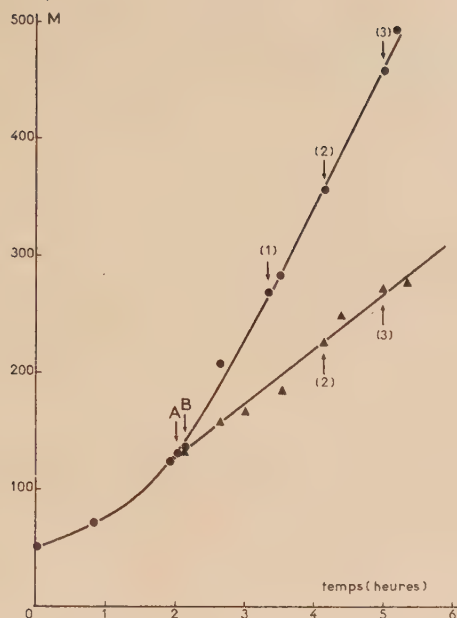


Fig. V - 14

BIOSYNTHESE INDUITE DU SYSTEME ACCUMULATEUR DE TPU : CROISSANCE
DES SUSPENSIONS BACTERIENNES EN PRESENCE ET EN L'ABSENCE DE β -2-
THIENYLALANINE

—●—●—●— Suspension sans β -2-thiénylalanine

—▲—▲—▲— Suspension avec β -2-thiénylalanine

M = masse bactérienne/unité de volume (exprimée en coordonnées spectrophotométriques arbitraires).

1, 2, 3 = n° des prises

A = addition de β -2-thiénylalanine ($2 \cdot 10^{-4} M$)

B = addition d'inducteur ($MU \cdot 10^{-3} M$)

TABLEAU V-7

BIOSYNTHESE INDUITE DU SYSTEME ACCUMULATEUR DE TPU EN PRESENCE
ET EN L'ABSENCE DE -2-THIENYLALANINE (complément de
la figure 14)

N° de la prise	Suspension bactérienne*	Accroissement de poids sec bactérien ($\mu\text{g/ml}$) à partir de l'addition d'inducteur	TPU accumulé dans les cellules ($\text{m}\mu\text{moles/100 ml}$ de suspension)** = "Capacité totale"
1	sans thiényl-alanine	137	16
2	sans thiényl-alanine	230	400
	avec thiényl-alanine	83	2
3	sans thiényl-alanine	319	704
	avec thiényl-alanine	112	0

* Culture en voie de croissance exponentielle, divisée en 2 lots dont l'un reçoit de la β -2-thiénylalanine ($2 \cdot 10^{-4}\text{M}$). L'inducteur (10^{-3}M) est ajouté 5 minutes après dans les deux cultures (Source d'énergie : succinate ; température d'agitation de la culture : 34°C).

** Le TPU accumulé est mesuré dans les conditions usuelles : incubation de la suspension bactérienne à 34°C , en présence de TPU 10^{-3}M exogène, pendant 10 minutes.

TABLEAU V - 8

INHIBITION SPECIFIQUE DE L'ACCUMULATION DU TPU DANS LES CELLULES D'E. COLI
ML30

Nom de la substance ajoutée	μ moles TPU ³⁵ S accumulé /g de poids sec bactérien.	Inhibition % de l'accumulation.
Néant (témoin d'accumulation)	47	0
Phényl- β -D-glucuronide	0	100
O-Aminophényl- β -D-glucuronide	0	100
Méthyl- β -D-glucuronide	6	87
Cyclohexyl- β -D-glucuronide	0	100
Méthyl- β -D-thiogluconide	6	87
Propyl- β -D-thiogluconide	5	89
Acide aldobiouronique *	12	74
Acide cellobiouronique	18	62
Méthyl- β -D-thiogluconide, ester méthylique	47	0
Cyclohexyl- β -D-glucuronide, ester méthylique	40	15
Méthyl- β -D-glucuronide, amide	47	0
Ethyl- β -D-glucuronide, amide	47	0
Acide glucuronique	48	0
Acide galacturonique	49	0
Méthyl- β -D-glucoside	46	2
Phényl- β -D-thiogluconide	45	4

* Galactosyl- β -D-glucuronide provenant de l'hydrolyse de la gomme arabique (voir chap. III p. 39) Suspension bactérienne incubée 10mn à 34°C, en présence de TPU³⁵S $5 \cdot 10^{-4}$ M exogène et de la substance inhibitrice à la concentration de $2 \cdot 10^{-2}$ M.

que nous avons essayés (et dans une zone de concentration de $10^{-3}M$ à $5 \cdot 10^{-5}M$ pour le TPU) : le méthyl- β -D-glucuronide (MU), le méthyl- β -D-thiogluconide (TMU) et le propyl- β -D-thiogluconide (TPrU) (fig.15, 16,17). Les graphiques en coordonnées inverses montrent en effet qu'en présence d'inhibiteur, la valeur de Y de la relation (2) n'est pas changée (droites "avec" et "sans inhibiteur" concourantes à leur point d'intersection avec l'axe des ordonnées), alors que la valeur apparente de K est augmentée en présence d'inhibiteur (abscisse d'ordonnée = 0 diminuée en valeur absolue). Nous avons pu ainsi déterminer la valeur des constantes K_i relatives aux inhibiteurs, c'est-à-dire la valeur de la constante K de la relation (2) pour les trois glucuronides cités*). Pour le MU, K est de l'ordre de grandeur de $6 \cdot 10^{-4}M$, pour le TMU, K est de l'ordre de grandeur de $4 \cdot 10^{-4}M$ et pour le TPrU enfin, K est de l'ordre de grandeur de $4 \cdot 10^{-4}M$ (2 déterminations avec une erreur standard de l'ordre de $1,5 \cdot 10^{-4}M$). On en déduit que ces trois glucuronides ont une affinité comparable pour le système accumulateur et qu'elle est de l'ordre de 10 à 20 fois inférieure à celle du TPU. Nous n'avons pu cependant mettre en évidence une inhibition de l'accumulation de TPU par le phénolpthaléine- β -D-glucuronide (PPU), même avec un rapport inhibiteur/substrat de 500 (ce rapport maximum étant imposé par la limite de solubilité du PPU d'une part et la limite de précision des mesures pour le TPU³⁵S d'autre part). On peut en déduire que le PPU a une affinité extrêmement faible pour le système accumulateur de TPU et le calcul montre que sa constante K (relation (2)) est en tous cas supérieure à $10^{-1}M$. Ce manque d'affinité du PPU pour le système accumulateur s'assortit du reste effectivement d'une faible

* On sait que dans le graphique en coordonnées inverses, le point d'intersection de la droite correspondant à la présence d'inhibiteur a pour abscisse :
$$-\frac{1}{K_s \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}, \quad K_s \text{ constante de HENRI-MICHAELIS,}$$
 [I] concentration d'inhibiteur.

pénétration du PPU à l'intérieur des cellules de la souche ML30 et aussi de la souche K12S d'E. coli. On constate en effet une très forte différence entre la vitesse d'hydrolyse du PPU mesurée d'une part in vivo sur une suspension cellulaire pleinement induite pour la glucuronidase, et d'autre part sur la même suspension traitée au toluène (dans les conditions citées au chap.VI) pour supprimer la semi-perméabilité cellulaire: pour la suspension intacte cette vitesse d'hydrolyse ne représente que 3 à 4 % de la valeur déterminée avec la suspension traitée au toluène.

Nous avons cherché à mettre en lumière le caractère d'individualité du système accumulateur de glucuronides par l'expérience décrite au tableau 9. Trois lots identiques de cultures d'E. coli ML30, étaient, l'un induit par un glucuronide (MU), l'autre par un galactoside (isopropyl- β -D-thiogalactoside), inducteur de la galactoside-perméase (voir COHEN et MONOD 1957) et le troisième par les deux glycosides à la fois. On constate que la spécificité d'induction est stricte, chaque glycoside n'induisant que le système correspondant à sa propre catégorie ; les deux systèmes sont cependant inductibles simultanément dans les mêmes cellules en présence des deux inducteurs. L'individualité de fonctionnement des deux systèmes est également bien marquée, puisque dans les cellules induites simplement pour l'accumulation de l'un des glycosides, cette accumulation n'est pas inhibée par le glycoside hétérologue non radioactif ; dans les cellules doublement induites les glycosides sont accumulés simultanément chacun pour leur compte, et à un niveau comparable à celui des cellules simplement induites ; leur accumulation n'est pas non plus inhibée par la présence du glycoside hétérologue. Chaque système est donc synthétisé indépendamment et fonctionne indépendamment, sans que l'on puisse déceler aucune interférence.

A ce stade un problème se pose : l'un des constituants au moins du système accumulateur de TPU n'est-il pas justement la β -glucuronidase elle-même ? Cela serait plausible étant donné l'analogie de ce système avec un enzyme proprement dit (propriété d'inductibilité, synthèse liée à celle des protéines, propriétés cinétiques, stéréospécificité étroite).

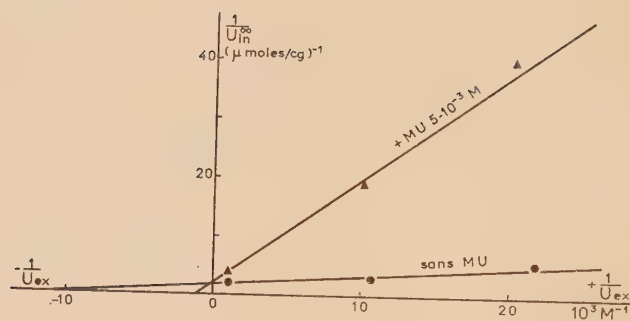


Fig. V - 15

INHIBITION COMPETITIVE DE L'ACCUMULATION DU TPU PAR LE MU

(coordonnées inverses - 34°C)

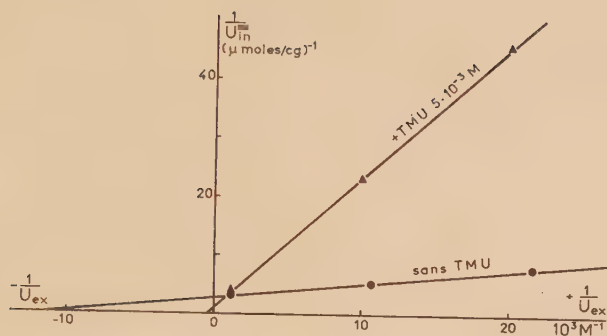


Fig. V - 16

INHIBITION COMPETITIVE DE L'ACCUMULATION DU TPU PAR LE TMU

(Coordonnées inverses - 34° C)

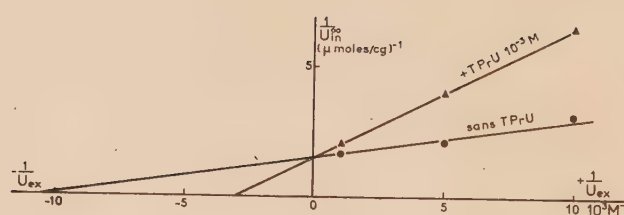


Fig. V - 17

INHIBITION COMPETITIVE DE L'ACCUMULATION DU TPU PAR LE TPrU

(Coordonnées inverses - 34°C)

TABLEAU V- 9

SYNTHESE ET FONCTIONNEMENT INDEPENDANTS DES SYSTEMES ACCUMULATEURS
DE GLUCURONIDES ET DE GALACTOSIDES

Nature de l'inducteur ajouté à la culture	μ moles de composé radioactif accumulé par g de poids sec bactérien en présence des substances suivantes :			
	TPU ³⁵ S*	TMG ³⁵ S**	TPU ³⁵ S* + TMG ³² S***	TMG ³⁵ S** + TPU ³² S****
Méthyl- β -D-glucuronide 10^{-3} M	57	1	56	-
Isopropyl- β -D-thiogalacto- side 10^{-3} M	1	93	-	124
Méthyl- β -D-glucuronide 10^{-3} M + Isopropyl- β -D- thiogalactoside 10^{-3} M	64	100	66	85

- * Phényl- β -D-thioglucuronide marqué au ^{35}S , concentration $5 \cdot 10^{-3}\text{M}$
 ** Méthyl- β -D-thiogalactoside marqué au ^{35}S , concentration $5 \cdot 10^{-3}\text{M}$
 *** Méthyl- β -D-thiogalactoside non radioactif, concentration $5 \cdot 10^{-3}\text{M}$
 **** Phényl- β -D-thioglucuronide non radioactif, concentration $5 \cdot 10^{-3}\text{M}$

Incubation des suspensions bactériennes dans les conditions usuelles à
 34°C pendant 10 minutes.

En l'absence de preuves directes (impossibilité d'isoler et de caractériser le système accumulateur in vitro), des arguments indirects, mais tout de même probants, peuvent être avancés contre l'hypothèse de l'identité de ces deux systèmes.

D'une part, ainsi que nous le verrons au chapitre VI (p.170) il existe des souches d'E. coli (K12S) chez qui l'activité accumulatrice ne peut être induite, alors que ces mêmes souches produisent par induction des quantités normales de glucuronidase (pourvu que la concentration d'inducteur ajouté soit suffisamment forte).

D'autre part, les affinités relatives des divers glucuronides pour ces deux systèmes varient beaucoup, comme on le voit dans le tableau 10. Ces constantes, il est vrai, ne sont pas déterminées tout à fait dans les mêmes conditions, mais sur le plan qualitatif les indications qu'elles fournissent n'en sont pas moins significatives. Ainsi, par exemple, le PPU a relativement beaucoup plus d'affinité pour la glucuronidase que le MU, alors que ce dernier en a relativement beaucoup plus que le PPU pour le système accumulateur. Ces observations nous paraissent difficiles à concilier avec l'hypothèse de l'identité des deux systèmes.

En conclusion, on peut affirmer que le système accumulateur de glucuronides chez E. coli présente une individualité bien marquée de synthèse et de fonctionnement, des caractères de stéréospécificité très accentués et qu'il est distinct de l'enzyme catalysant spécifiquement l'hydrolyse des glucuronides.

7 . DISCUSSION DES RESULTATS ET CONCLUSIONS

Les principales propriétés du système accumulant les glucuronides chez E. coli peuvent se résumer comme il suit :

TABLEAU V - 10

AFFINITES RELATIVES DE DIVERS GLUCURONIDES POUR LE SYSTEME
ACCUMULATEUR DE GLUCURONIDES ET POUR LA β -GLUCURONIDASE

(valeurs tirées du chap. V, respectivement du
chap. IV).

Glucuronide	Constantes de dissociation*		Affinités relatives** (MU = 1)	
	Système accu- mulateur	Glucuronidase	Système accumu- lateur	Glucuro- nidase
MU	$6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$3,8 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	1	1
PPU	$> 10^{-1} \text{ M}$	$3,1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$< 0,006$	1230
TMU	$4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$5,7 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	1,5	0,7
TPrU	$4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$4,7 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	1,5	8
TPU	$9 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$1,1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	6,7	34, 6

* Soit K de la relation $U_{in}^{\infty} = Y \frac{U_{ex}}{U_{ex} + K}$ pour le système accumulateur

(déterminé in vivo en milieu 63 à 34°C) et constante de HENRI-MICHAELIS (K_S ou K_i) pour la glucuronidase (déterminé in vitro, en tampon phosphate $2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ pH 7,1, 38°C)

** En assimilant la constante d'affinité à l'inverse des constantes définies ci-dessus.

1°) La cellule d'E. coli est normalement très peu perméable aux glucuronides, ainsi qu'en témoigne la crypticité des cellules à l'égard de l'hydrolyse du PPU. Cette imperméabilité est compensée par un système capable d'accumuler les glucuronides à l'intérieur de la cellule à une concentration de beaucoup supérieure à la concentration du milieu extérieur. Cette accumulation n'entraîne pas de modification chimique du glucuronide accumulé (tout au moins pour le TPU).

2°) L'accumulation est réversible, le TPU accumulé à l'intérieur des cellules s'échange constamment avec le TPU du milieu externe. La concentration interne atteinte à l'équilibre varie en fonction de la concentration externe selon une loi analogue à celle qui gouverne l'activité des enzymes en fonction de la concentration en substrat (loi de HENRI-MICHAELIS). La vitesse d'entrée initiale du TPU obéit à une loi similaire, mais régie par des constantes différentes.

3°) Le système d'accumulation est étroitement stéréospécifique sur le plan fonctionnel : seuls les glucuronides à radical glucuronyle non substitué ni modifié sont capables d'inhiber - et ce de manière compétitive - l'accumulation intracellulaire du TPU.

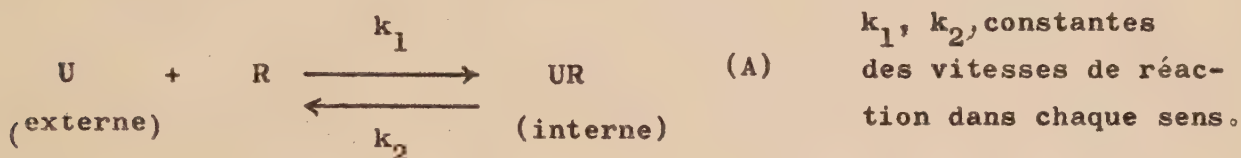
4°) L'individualité marquée de ce système est encore mise en évidence par le fait que dans des cellules présentant simultanément la faculté d'accumuler d'autres glycosides de manière similaire, il fonctionne de façon absolument indépendante. En outre, il s'avère différent de la β -glucuronidase elle-même par nombre de ses propriétés.

5°) Enfin, la biosynthèse de ce système est inductible spécifiquement par les glucuronides et selon une loi identique à celle qui contrôle l'induction des enzymes ; de plus elle dépend étroitement de la synthèse des protéines. Il est donc difficile de ne pas admettre l'existence d'une protéine responsable de l'activité stéréospécifique de ce système.

Ces propriétés soulignent l'étroite analogie qui existe entre ce système et les systèmes enzymatiques classiques. Elles concordent avec

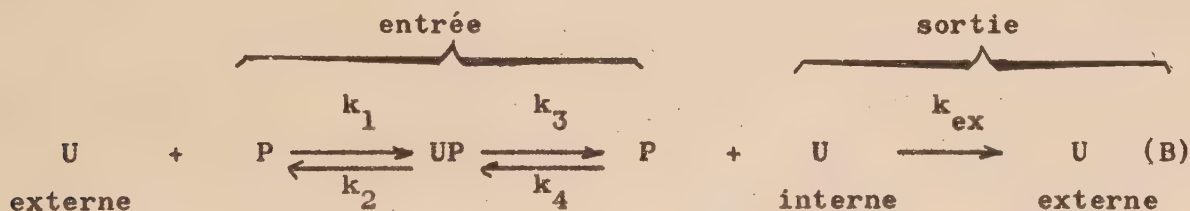
celles qui découlent de la notion de perméase, telle qu'elle a été définie par RICKENBERG, COHEN, BUTTIN et MONOD (1956).

Avec ces auteurs, nous pouvons considérer qu'a priori deux mécanismes sont possibles pour expliquer l'accumulation intracellulaire du TPU. La première interprétation ("modèle stoechiométrique") consiste à admettre que les glucuronides (U) sont accumulés par combinaison avec des récepteurs spécifiques (R) présents dans l'espace intracellulaire, selon la réaction :



Dans ce cas, la constante K de la relation empirique (2) représente le rapport $\frac{k_2}{k_1}$, la constante de dissociation du système, et la constante Y le $\frac{k_2}{k_1}$ nombre total de récepteurs R présents.

On peut aussi supposer ("modèle catalytique") que ce sont des constituants spécifiques P du système qui catalysent l'entrée des glucuronides dans la cellule, mais sans servir d'accepteurs finaux :



($k_1, k_2, k_3, k_4, k_{\text{ex}}$ sont les constantes des vitesses de réaction). La sortie se ferait par un processus distinct, par diffusion passive selon l'hypothèse la plus simple. Dans ce cas la variation de la concentration interne $\frac{dU_{\text{in}}}{dt}$ résulte à tout moment de la différence entre la vitesse d'entrée V_{in} et la vitesse de sortie V_{ex} (relation (1)) :

$$\frac{dU_{\text{in}}}{dt} = V_{\text{in}} - V_{\text{ex}} \quad (1)$$

En admettant pour la réaction d'entrée une cinétique de HENRI-MICHAELIS

$$V_{in} = V_{in}^{max} \frac{U_{ex}}{U_{ex} + K} \quad (4)$$

V_{in}^{max} = vitesse d'entrée maximum à saturation

U_{ex} = concentration externe en glucuronide

$$K = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (k_4 \text{ supposé négligeable})$$

et pour la réaction de sortie une vitesse proportionnelle à la concentration U_{in} , on a :

$$\frac{dU_{in}}{dt} = V_{in}^{max} \frac{U_{ex}}{U_{ex} + K} - k_{ex} U_{in} \quad (5)$$

A l'équilibre $\frac{dU_{in}}{dt} = 0$, U_{in} devient U_{in}^{∞}

$$\text{et } U_{in}^{\infty} = \frac{V_{in}^{max}}{k_{ex}} \times \frac{U_{ex}}{U_{ex} + K} \quad (6)$$

En posant $\frac{V_{in}^{max}}{k_{ex}} = Y$ on retrouve la relation empirique (2)

$$U_{in}^{\infty} = Y \frac{U_{ex}}{U_{ex} + K} \quad (2)$$

Les 2 modèles expliquent la saturation de U_{in} , la réversibilité, l'équilibre et la spécificité du système. Mais chacun d'eux entraîne en outre des prédictions distinctes.

Selon le modèle stoechiométrique, on a $V_{in} = k_1 (R) (U)$ c'est-à-dire que la vitesse d'entrée est proportionnelle au nombre de récepteurs libres

et à la concentration externe en glucuronide ; V_{in} ne se sature donc pas en fonction de U_{ex} et doit être plus grand en phase initiale qu'en régime stationnaire où le nombre de récepteurs libres est diminué. Au contraire, dans le modèle catalytique, nous avons $V_{in} = V_{in}^{max} \frac{U_{ex}}{U_{ex} + K}$ et cette vitesse doit être la même en régime initial et en régime stationnaire, elle doit devenir constante ($= V_{in}^{max}$) et indépendante de U_{ex} pour des valeurs suffisamment grandes de U_{ex} (saturation) ; enfin pour des valeurs non saturantes d' U_{ex} , V_{in} doit dépendre d' U_{ex} selon une isotherme d'adsorption de la forme $V_{in} = y \frac{U_{ex}}{U_{ex} + K}$ (3) et être proportionnelle au niveau U_{in}^{∞} atteint pour une valeur donnée d' U_{ex} (relation (2)).

Or nous avons vu que les vitesses d'entrée (assimilables à la variation initiale de U_{in} en fonction du temps, car à ce moment U_{in} est négligeable et $V_{ex} \neq 0$, donc (1) devient $\frac{d U_{in}}{dt} = V_{in}$) sont pratiquement identiques en régime initial et en régime stationnaire (fig. 5) ; elles obéissent à une loi de saturation en fonction d' U_{ex} (fig.9) revêtant la forme d'une isotherme d'adsorption. Ces observations, incompatibles avec le modèle stoechiométrique, cadrent parfaitement avec l'hypothèse catalytique. Un calcul rend de plus fort invraisemblable le modèle stoechiométrique. L'accumulation peut dans certains cas aller jusqu'à 60 μ moles de TPU par g de poids sec bactérien. Si l'on suppose le TPU fixé sur des accepteurs protéiques spécifiques, cela représente environ 1 accepteur par fraction de protéine bactérienne d'un poids moléculaire moyen de 10.000 , ce qui est évidemment inadmissible.

Il faut cependant faire remarquer que deux observations entrent difficilement dans le cadre du schéma catalytique simple (B) et des relations (4) et (2) qui en découlent. La constante K de la vitesse d'entrée V_{in} semble différer de la constante K du niveau U_{in}^{∞} à l'équilibre et il n'y a pas proportionnalité entre V_{in} et U_{in}^{∞} pour une même concentration externe en TPU . Ce modèle catalytique, tel qu'il est décrit, ne constitue donc qu'une approximation simplifiée du mécanisme réel. Les quelques divergences que nous avons constatées entre les prévisions qu'il entraîne

et les faits, laissent supposer que d'autres facteurs, encore indéterminés, jouent également un rôle dans ce phénomène. Il ne faut du reste pas perdre de vue que la mesure de l'accumulation des glucuronides, qui résulte selon toute vraisemblance d'une série de réactions complexes, ne se superpose pas forcément avec la mesure de la quantité et de l'activité de la protéine que nous présumons être spécifiquement responsable de cette accumulation. Il faut mentionner à l'appui de cette idée le cas de la souche K12S, chez qui le défaut d'accumulation des glucuronides ne semble pas résulter en définitive de l'absence totale d'un système de perméation pour ces corps, ainsi que nous le verrons au chapitre suivant.

En conclusion, le système accumulateur de glucuronides chez E. coli se caractérise comme un système de nature protéinique catalysant la pénétration des glucuronides exogènes à travers une barrière cellulaire peu perméable ; il présente les propriétés de stéréospécificité et la cinétique d'activité et d'inductibilité d'un enzyme ; mais il est distinct et fonctionne indépendamment de la glucuronidase elle-même. Nous avons vu en outre que l'accumulation des glucuronides n'interfère en aucune manière avec celle d'autres glycosides comme les galactosides. Ceci souligne l'individualité prononcée des systèmes accumulant chacun l'un de ces deux types de glucides, individualité comparable en tous points à celle que l'on constate dans le cas de deux enzymes distincts (comme la glucuronidase et la galactosidase par exemple). Ces caractéristiques répondant à la définition des perméases données par COHEN, MONOD et coll. , nous proposons pour ce système le nom de glucuronide-perméase.

CHAPITRE VI

BIOSYNTHESE DE LA β -GLUCURONIDASE CHEZ ESCHERICHIA COLI

1. INTRODUCTION

La β -glucuronidase d'Escherichia coli est essentiellement un enzyme inductible , c'est-à-dire un enzyme dont la synthèse , figurant en puissance parmi les possibilités du métabolisme cellulaire, n'est cependant déclenchée que grâce à l'intervention spécifique d'une substance définie appelée inducteur. Nous verrons toutefois ultérieurement que certaines souches d'E. coli peuvent acquérir la possibilité de produire spontanément la glucuronidase, sans l'intervention d'inducteur exogène. .

Les mécanismes précis qui président à la biosynthèse induite des enzymes ne sont pas encore connus avec certitude. Cependant, ainsi que nous l'avons vu au chapitre I, il se dégage de la masse des observations accumulées au cours de ces dernières années, un ensemble de faits cohérents qui rendent nos conceptions plus claires dans ce domaine, nous permettant d'édifier un schéma d'ensemble de plus en plus complet et de plus en plus vraisemblable. Nous nous proposons de démontrer dans ce chapitre en quoi l'étude de la formation induite de la glucuronidase contribue à ce résultat.

2. MATERIEL ET TECHNIQUES

Produits chimiques

Pour les glucuronides, se reporter au chapitre III.

Les autres glycosides suivants étaient des produits de synthèse :
phényl- β -D-thioglucoside (FISCHER et DELBRUCK 1909), isopropyl- β -D-

thiogalactoside (HELPERICH et TURK 1956), méthyl- α -L-thioarabinoside (Prof. HELPERICH, Bonn/Allemagne), méthyl- β -D-fructoside (Prof. STACEY, Birmingham/Angleterre).

Tous les autres produits étaient commerciaux.

Souches

Elles avaient la même provenance que celles mentionnées au chapitre V' (p. 72) .

Conditions de culture des bactéries et d'expérimentation-type

Sauf mentions spéciales, toutes les expériences étaient réalisées sur des suspensions bactériennes en voie de croissance exponentielle sur milieu synthétique liquide (milieu salin minimum "63" (SISTROM 1958) tamponné à pH 7 et additionné d'une source de carbone et d'énergie, généralement du glycérol à 2 mg/ml) et en aérobiose (agitation en fioles coniques à 37°). La masse bactérienne, exprimée en poids sec de cellules par unité de volume de la culture, était déterminée par mesure de l'absorption à 600 m μ dans un spectrophotomètre préalablement étalonné.

Dosage de la β -glucuronidase

Il repose sur la mesure de l'activité de cet enzyme telle qu'elle est définie au chapitre IV p. 43 (extrait enzymatique brut). Les épreuves d'activité sont réalisées directement en milieu 63 (essentiellement un tampon au phosphate de potassium 0,1M à pH7) sur un volume réactionnel total de 1,8 ml. L'addition de tampon glycine-soude (0,7 ml) à la fin de la réaction provoquant souvent l'apparition d'un précipité dans le milieu 63, celui-ci était éliminé au bout de 30 minutes (précipitation maximum) par centrifugation * avant la mesure photométrique (25 mn à 15000 g à 0°).

* Eliminant également les débris cellulaires dans le cas d'extraits au toluène.

La β -glucuronidase étant chez E. coli, un enzyme intracellulaire, non libéré dans le milieu de culture et inaccessible au PPU[•] (voir chapitre V p.104), nous extrayons l'enzyme par deux méthodes : soit par un traitement au toluène (agitation de la suspension 20 mn à 37° en présence de 1/50^e de volume de toluène) qui détruit la semi-parméabilité cellulaire ; soit par une désintégration sonique à l'aide d- l'oscillateur "Raytheon" (9Kc) durant 5 mn (en présence de β -mercaptoéthanol 10^{-3} M) qui solubilise pratiquement tout le contenu cellulaire. Cette dernière méthode donne des résultats parfaitement reproductibles, aussi l'avons-nous utilisée pour toutes les mesures précises. Le traitement au toluène, plus commode mais moins fidèle dans ses résultats, a été réservé pour les expériences qualitatives ou grossièrement quantitatives.

L'assimilation de l'accroissement d'activité enzymatique observée au cours du processus d'induction à la synthèse effective d'une molécule nouvelle d'enzyme suppose d'une part que l'enzyme soit bien identifié et ses propriétés bien connues ; les variations d'activité observées peuvent alors être rapportées sans erreur possible à des variations de quantité d'enzyme. La certitude en est apportée dans notre cas, par les résultats énoncés au chapitre IV. Il faut d'autre part prouver que l'accroissement d'activité induite correspond à l'apparition d'une molécule protéique nouvelle. Cette hypothèse a effectivement été vérifiée dans plusieurs cas d'induction enzymatique (voir au chap. I). Bien que les preuves directes fassent encore défaut dans notre système, nous verrons que les expériences réalisées avec des inhibiteurs spécifiques de la synthèse protéique s'interprètent difficilement d'une autre manière.

-
- Phénolphtaléine- β -D-glucuronide, substrat chromogène, voir chapitre IV.

3. MISE EN EVIDENCE DE L'INDUCTIBILITE DE LA GLUCURONIDASE . SPECIFICITE DE L'INDUCTION

Dans les cultures ordinaires d'E. coli ML30 en voie de croissance exponentielle, on ne décèle généralement aucune activité β -glucuronidasi-que. Compte tenu des conditions expérimentales et de la sensibilité des mesures photométriques, cela revient à dire que les cellules ont, dans certains cas, une activité spécifique (exprimée en $m\mu$ moles de PPU hydrolysé $\times mn^{-1} \times g^{-1}$ de poids sec bactérien) inférieur à 30 (limite au-dessous de laquelle les mesures cessent d'être significatives). Parfois cependant (et surtout avec des cellules en fin de croissance) on peut mettre en évidence une très faible activité "de base", variant entre 50 et 150 et généralement plus proche de 50. Par contre, lorsque les bactéries ont effectué leur croissance en présence d'un β -glucuronide, l'activité glucuronidasique spécifique peut atteindre une valeur plus ou moins élevée selon la structure du glucuronide ajouté (tableau 1).

Les chiffres reportés ici sont un peu variables d'une expérience à l'autre (généralement de l'ordre 10-30 %, mis à part le cas du méthylthiogluconide où les variations peuvent être plus considérables). Ils permettent néanmoins une interprétation qualitative raisonnable du phénomène.

On constate que les glucuronides "vrais" essayés, à trois exceptions près (menthyl- et bornyl- glucuronides * et acide aldobiouronique) sont

-
- Certains auteurs cependant (BUEHLER et coll., 1949^a et 1951 ; DOYLE et coll. 1955 ; SMITH et MILLS 1950 ; BEALL et GRANT 1952) ont signalé que la présence de menthyl- ou de bornyl-glucuronide dans les cultures de certaines souches d'E. coli favorisait la formation de la β -glucuronidase. Mais leurs conditions d'expérience (en particulier cultures de plusieurs jours) diffèrent notablement des nôtres.

TABLEAU VI - 1

INDUCTEURS DE LA β -GLUCURONIDASE CHEZ E. COLI ML30

Catégorie	Nom de l'inducteur essayé	Con- centra- tion.	Activité spécifique des bactéries
non induit	néant		# 0 (< 30)
β -Glucuronides "vrais" "bons inducteurs"	Méthyl- β -D-glucuronide Phényl- β -D-glucuronide Benzyl- β -D-glucuronide p-Crésyl- β -D-glucuronide Cyclohexyl- β -D-glucuronide	$10^{-3}M$ $10^{-3}M$ $10^{-3}M$ $10^{-3}M$ $10^{-3}M$	15.400 6.800 7.500 10.900 11.300
β -Glucuronides "vrais" estérifiés sur la fonc- tion acide en 6.	Ester méthylique (en 6) du phényl- β - -D-glucuronide Ester méthylique (en 6) du benzyl- β - -D-glucuronide Ester méthylique (en 6) du p-Crésyl- β - D-glucuronide Ester méthylique (en 6) du Cyclohexyl- β - -D-glucuronide	$10^{-3}M$ $10^{-3}M$ $10^{-3}M$ $10^{-3}M$	6.900 5.100 10.300 8.300
β -Glucuronides "vrais" amides de la fonction acide en 6	Amide (en 6) du méthyl- β -D-glucuronide Amide (en 6) de l'éthyl- β D-glucuronide Amide (en 6) de l'isopropyl- β -D-glucu- ronide Amide (en 6) du β (1-D-glucosyl)- β -D- glucuronide	$10^{-3}M$ $10^{-3}M$ $10^{-3}M$ $10^{-3}M$	0 (< 30) 0 (< 30) 0 (< 30) 0 (< 30)

TABLEAU VI - 1 (suite)

Catégorie	Nom de l'inducteur essayé	concentration	Activité spécifique des bactéries
β -Glucuronides vrais (et acide glucuronique) pratiquement non inducteurs	L-menthyl- β -D-glucuronide	10^{-3} M	40
	Bornyl- β -D-glucuronide	10^{-3} M	70
	Acide aldobiouronique (6-galactosyl- β -D-glucuronide)	5×10^{-3} M	50
	Acide glucuronique (sel de potassium)	10^{-3} M	120
β -Thioglucuronides	Méthyl- β -D-thioglucuronide	10^{-3} M	1200
	Ethyl- β -D-thioglucuronide	10^{-3} M	250
	Propyl- β -D-thioglucuronide	10^{-3} M	500
	Isopropyl- β -D-thioglucuronide	10^{-3} M	450
	Phényl- β -D-thioglucuronide	10^{-3} M	950
	Benzyl- β -D-thioglucuronide	10^{-3} M	300
	Ester méthylique du Benzyl- β -D-thioglucuronide	10^{-3} M	300
Autres glycosides divers	Méthyl- β -D-glucoside	$5 \cdot 10^{-3}$ M	0 (<30)
	Phényl- β -D-thiogluco-side	$5 \cdot 10^{-3}$ M	0 (<30)
	Isopropyl- β -D-thiogalactoside	$5 \cdot 10^{-3}$ M	0 (<30)
	Méthyl- β -D-fructoside	$5 \cdot 10^{-3}$ M	0 (<30)
	Méthyl- β -D-mannoside	$5 \cdot 10^{-3}$ M	0 (<30)
	Méthyl- β -D-xyloside	$5 \cdot 10^{-3}$ M	0 (<30)
	Méthyl- α -L-thic-arabinoside	$5 \cdot 10^{-3}$ M	0 (<30)

(Suspensions traitées au toluène et provenant de cultures exponentielles sur succinate (4 mg/ml) ayant effectué environ 4 doublements en présence d'inducteur).

tous de bons inducteurs de la β -glucuronidase et qu'ils ont tous un pouvoir inducteur sensiblement du même ordre de grandeur (hormis le méthyl-glucuronide, nettement plus inducteur que les autres). Les glucuronides estérifiés sur la fonction acide en 6 ont un pouvoir inducteur comparable à celui des acides libres correspondants. Par contre les amides correspondant aux mêmes glucuronides ne sont pas inductrices. L'acide glucuronique n'est que faiblement inducteur.

Les thioglucuronides utilisés, eux aussi, induisent tous la formation de la glucuronidase, mais nettement moins que les glucuronides vrais (10 fois moins ou davantage). L'estérification du groupement acide en 6 n'abolit pas non plus la fonction inductrice (benzyl-thioglucuronide).

Enfin aucun des autres glycosides variés que nous avons essayés n'est inducteur de la glucuronidase.

La première conclusion qui s'impose est l'étroite spécificité de l'inductibilité de la β -glucuronidase chez l'organisme considéré. En effet, seuls les glycosides à radical glucuronyle intact s'avèrent inducteurs. (quelle que soit par ailleurs la nature de leur aglycone). Les thioglucuronides, qui sont les proches analogues stériques des glucuronides - ils n'en diffèrent que par la substitution d'un atome de S à l'atome d'O de la liaison osidique - sont encore inducteurs. Mais toute autre modification minime de la structure glucidique, comme la substitution d'une fonction amide à la fonction acide en 6[°], ou le remplacement de cette fonction acide par une fonction alcool (méthyl-glucoside, phényl-thiogluco-side) ou cette même variation accompagnée de l'inversion de la position spatiale d'un hydroxyle (galactoside) ou encore la disparition du carbone en 6 (xyloside) entraîne l'annulation de la fonction inductrice.

* L'estérification de la fonction acide en 6 fait exception. Mais nous verrons (p. 124) que ces esters sont vraisemblablement hydrolysés in vivo au préalable par une estérase.

4. "LA GRATUITE" DANS L'INDUCTION -

Nous avons déjà fait allusion (chap. I) à l'important rôle joué dans l'étude de l'induction enzymatique par la méthodologie de la "gratuité" introduite voici près de 10 ans par MONOD et COHN (1952).

En effet, dans bien des cas d'induction enzymatique étudiés auparavant (voir les revues de SPIEGELMAN 1950 et STANIER 1951), l'inducteur était en même temps substrat de l'enzyme et seule source d'énergie et de carbone utilisable par la cellule. Il en résultait trois types de complications, risquant de masquer ou de fausser l'aspect cinétique réel du processus inductif. En premier lieu, l'induction d'un enzyme par un substrat métabolisable se traduit non seulement par la synthèse de cet enzyme, mais encore par l'instauration d'une séquence métabolique dont les effets (apport d'énergie et de matériaux de base pour les synthèses) agissent en retour sur le phénomène primaire de l'induction. Un processus autocatalytique s'installe alors, qui modifie l'allure cinétique réelle de l'induction en soi. D'autre part se pose alors la question de l'homogénéité de la réponse individuelle des cellules à l'action de l'inducteur. Chaque cellule constituant une unité métabolique distincte et close, réagira différemment selon son propre état physiologique, et les plus réceptives à l'influence de l'inducteur seront favorisées et sélectionnées petit à petit. La cinétique globale observée reflètera alors non plus la moyenne mais la somme des phénomènes opérant au niveau cellulaire. Enfin une expérience conduite dans de telles conditions de "non gratuité" risque d'entraîner la sélection de mutants génétiques préexistants (constitutifs pour l'enzyme considéré par exemple) et les résultats seront alors entièrement faussés.

C'est pour remédier à ces divers inconvénients que MONOD et ses collaborateurs préconisèrent l'emploi d' "inducteurs gratuits" , non métabolisables par la cellule (MONOD , COHEN-BAZIRE et COHN 1951 ; BUTTIN 1955 ; MONOD 1956), permettant de séparer le phénomène d'induction des effets métaboliques secondaires. De plus, d'élégantes expériences dues

à BENZER (1953) ont prouvé que dans une population cellulaire induite dans des conditions de gratuité, la réponse individuelle des cellules était effectivement homogène (alors que l'hétérogénéité des réponses apparaissait nettement dans les conditions de non gratuité).

Ainsi que nous allons le voir, les thioglucuronides constituent un exemple caractérisé d'inducteurs gratuits de la glucuronidase chez E. coli. A l'appui de cette thèse, quatre types de faits peuvent être invoqués :

a) Les thioglucuronides ne peuvent servir de substrat de croissance pour les bactéries :

La souche ML30ensemencée à faible densité ($5\mu\text{g}$ de poids sec/ml) en milieu minéral 63 additionné d'un "glucuronide vrai" ou de ses esters méthyliques^a à 2 mg/ml (méthyl-, phényl-, benzyl-, p-crésyl- β -glucuronides) comme seule source de carbone et d'énergie s'y développe très bien jusqu'à une forte densité cellulaire (de l'ordre de $400\mu\text{g}$ de poids sec/ml). Ainsi par exemple sur méthyl-glucuronide, le rendement total de croissance (MONOD 1949^b) est de 230 mg de poids sec/g de substrat (glucose : 370, acide glucuronique : 150) et le taux de croissance (MONOD 1949^b) : 0,6 (glucose : 1,3, acide glucuronique : 1).

Par contre, la densité optique d'une suspension de ML30, ensemencée dans les mêmes conditions en présence de méthyl- ou de phényl- β -thioglucuronide comme seule source de carbone et d'énergie, reste invariable même après huit jours d'agitation à 37°. Cependant, dès qu'on ajoute une autre source d'énergie comme le succinate, la culture se met à croître normalement. On en conclut que les thioglucuronides, tout au moins le méthyl- et le phénylthioglucuronide, ne sont pas utilisables en tant que source de carbone et d'énergie par les cellules bactériennes.

b) Les thioglucuronides ne sont pas hydrolysables in vitro par la β -glucuronidase d'E. coli:

• Il est possible que dans ce cas, les bactéries produisent une estérase capable de libérer le glucuronide de son ester.

Nous avons vu au chapitre IV que la β -glucuronidase d'E. coli pouvait hydrolyser in vitro les glucuronides vrais (mise en évidence du pouvoir réducteur de l'acide glucuronique soit qualitativement par action de la liqueur de Fehling, soit quantitativement par la méthode de SOMOGYI (1945) et NELSON (1944)). La même préparation enzymatique essayée sur les thioglucuronides s'avère inactive.

En effet, dans les conditions où la liqueur de Fehling permet de mettre nettement en évidence une hydrolyse de 10 % au moins du méthyl- β -glucuronide (voir chap. IV p. 53 : 10^{-1} M, incubé à 1 h à 38°C avec une préparation enzymatique de forte activité *), la réaction reste entièrement négative avec le phényl- β -thioglucuronide.

Nous avons éprouvé de façon plus sensible l'hydrolyse in vitro de thioglucuronides, comme le méthyl- et le phényl- β -thioglucuronide, par la glucuronidase d'E. coli au moyen de la méthode de Somogyi-Nelson. Ces composés étaient incubés pendant 22 h à 38°C aux concentrations de 10^{-2} et 10^{-3} M, chacun dans les conditions usuelles pour le méthyl-glucuronide (voir chap. IV p. 54) et en présence d'une préparation enzymatique brute hautement active (0,5 ml d'un extrait sonique hydrolysant 800 m μ moles de méthyl-glucuronide x mn $^{-1}$ x ml $^{-1}$ d'extrait **). Dans ces conditions, et compte tenu de la sensibilité des techniques employées, une hydrolyse de 1%/ $\circ$ des thioglucuronides eût été décelable et une vitesse d'hydrolyse plus de 2500 fois plus faible que celle qui se manifeste avec le méthyl-glucuronide aurait pu être mise en évidence. L'expérience s'est avérée entièrement négative.

Nous en concluons que les thioglucuronides, tout au moins le méthyl- et le phényl- β -thioglucuronide, bien que doués d'affinité pour la β -glucuronidase d'E. coli in vitro (voir chap. IV) ne sont pas des subs-

* 0,1 ml d'un extrait brut hydrolysant 800 m μ moles de méthyl-glucuronide/mn/ml de solution enzymatique.

** En présence de 2 % (volume) de toluène pour éviter une éventuelle prolifération bactérienne.

trats de cet enzyme.

c) Les éléments du phényl-thiogluconide accumulé dans les cellules bactériennes ne sont pas incorporés dans les protéines de celles-ci.

Dans une culture bactérienne exponentielle et induite, ayant effectué environ 4 doublements en présence de phényl- β -thiogluconide (TPU) marqué au ^{35}S , la radioactivité accumulée par les cellules en est entièrement extractible par l'eau bouillante ; le culot bactérien résiduel, après extraction, ne contient pratiquement plus de radioactivité (tableau 2). Il en va de même du reste pour une suspension bactérienne induite et incubée 10 à 30 minutes en l'absence de source d'énergie en présence de TPU ^{35}S dans les conditions d'expérimentation habituelles du chapitre V (tableau 3).

Il est donc évident que le ^{35}S du TPU servant d'inducteur n'est pas incorporé dans les protéines bactériennes insolubles dans l'eau bouillante. Comme nous verrons plus loin que la totalité de la radioactivité extraite dans les conditions citées * se retrouve sous forme de TPU ^{35}S inchangé, on peut affirmer qu'aucun des éléments constitutifs de la molécule de l'inducteur n'est incorporé de façon stable dans les diverses fractions cellulaires d'E. coli (dans la limite de sensibilité des techniques utilisées, voir plus loin).

d) Le phényl-thiogluconide ayant servi à l'induction d'une culture bactérienne n'est pas modifié chimiquement.

Nous avons analysé par chromatographie sur papier le matériel radioactif provenant 1°) de la fraction extraite soit à l'eau bouillante, soit au méthanol bouillant des cellules d'une suspension bactérienne incubée 10 mn en présence de TPU ^{35}S 10^{-3}M (conditions expérimentales du tableau 3);

• On a du reste vu au chapitre V qu'il s'agit du TPU accumulé dans la cellule par l'intervention de la glucuronide-perméase.

TABLEAU VI - 2

DISTRIBUTION DE LA RADIOACTIVITE DANS UNE CULTURE AYANT EFFECTUE SA
CROISSANCE EN PRESENCE DE TPU³⁵S

Fraction de la culture [°]	Impulsions/minute** dans la fraction considérée, correspondant à 1 ml de culture primitive
Culture totale primitive	2.220
Surnageant de culture primitive ^{***}	2.210
Surnageant d'extraction aqueuse à 100° du culot bactérien ^{****}	11
Corps bactériens résiduels (après extraction à l'eau bouillante)	0,5

Culture exponentielle de 180 μ g de poids sec/ml ayant effectué environ 4 doublements sur succinate (4 mg/ml) en présence de TPU ³⁵S 10⁻⁴M (radioactivité spécifique environ 0,3 mC/m mole).

•• Déterminées comme il est dit au chap. V p.73 .

••• Centrifugation effectuée dans les conditions décrites au chap. V p.73 .

•••• Le culot bactérien provenant de 5 ml de culture initiale est extrait pendant 15 mn par 1,5 ml d'eau à 100° C. La "contamination passive" (0,8 μ l, voir chap. V p.73) est déduite du chiffre indiqué en regard.

TABLEAU VI - 3

DISTRIBUTION DE LA RADIOACTIVITE DANS UNE SUSPENSION BACTERIENNE INCUBEE
EN PRESENCE DE TPU³⁵S

Fraction de la suspension bactérienne ●	Impulsions/minute ^{●●} dans la fraction considérée correspondant à 1 ml de suspension primitive
Suspension totale primitive	34.960
Surnageant de la suspension primitive ●●●	34.510
Surnageant d'extraction aqueuse à 100° du culot bactérien ●●●●	447
Corps bactériens résiduels (après extraction à l'eau bouillante)	0

- Suspension réalisée dans les conditions générales décrites au chap. V p.72 (étude expérimentale de la glucuronide-perméase), de concentration 250 μ g de poids sec/ml, et agitée 10 minutes à 34° en présence de TPU³⁵S 10^{-3} M (d'activité spécifique environ 0,45 mC/mole) et en l'absence de source d'énergie.
- Déterminées dans les conditions citées au chap. V p. 73 .
- Centrifugation effectuée dans les conditions décrites au chap.Vp.73
- Le culot bactérien provenant de 5 ml de culture initiale est extrait pendant 5 mn par 1,5 ml d'eau à 100°C. La "contamination passive" (0,8 μ l, voir chap. V. p.73) est déduite du chiffre indiqué.

2°) du même type d'extrait d'une culture exponentielle ayant effectué 4 doublements environ sur succinate en présence de TPU ^{35}S 10^{-4}M (conditions du tableau 2); 3°) du surnageant de la même culture exponentielle (évaporé à sec sous vide à basse température, le résidu étant extrait au méthanol pour éliminer les sels minéraux jusqu'à épuisement de la radioactivité résiduelle). Les quantités chromatographiées correspondaient en moyenne à 50 μg de TPU et à environ 0,03 μC de ^{35}S . Nous avons utilisé la méthode descendante avec du papier Whatman 1 et le mélange propanol(65 ml), eau (20 ml), acide formique (15 ml) comme solvant. Lorsque le front du solvant avait parcouru les 4/5° de la longueur de la feuille, le chromatogramme était séché par un courant d'air froid ; il était révélé ensuite par autoradiographie durant le temps suffisant pour mettre en évidence la présence éventuelle d'une substance de radioactivité de l'ordre du 1/100 environ de celle du spot de départ. Les taches de tous les types d'extraits , 1, 2, et 3, s'avèrent indiscernables de celle d'un témoin de TPU ^{35}S (témoin externe et interne). On peut donc affirmer que le TPU du surnageant d'une culture ayant été induite par lui, ou celui que l'on extrait des cellules de cette culture ou encore celui extrait d'une suspension l'ayant accumulé pendant 10 minutes par le jeu de sa perméase, n'est pas transformé chimiquement ; ou qu'en tous cas il ne peut l'être que dans une proportion inférieure à 1 % de la quantité mise en oeuvre. Nous en concluons que durant le processus d'induction du système perméase-glucuronidase aussi bien que celui de la simple accumulation intracellulaire due à la perméase, la structure de la molécule de TPU ne subit aucune sorte de modification stable.

En résumé, les β -thioglucuronides - et en particulier le phényl- β -thioglucuronide - ne sont pas métabolisés ni incorporés par les bactéries, ni hydrolysables par la β -glucuronidase in vitro ; le processus d'induction qu'ils déclenchent et leur accumulation intracellulaire ont lieu sans modification chimique décelable de leur structure moléculaire. Ces corps constituent donc des exemples particulièrement nets d'inducteurs enzymatiques "gratuits", car ce sont les seuls pour lesquels il soit

démontré de façon indiscutable qu'ils ne participent en aucune manière au métabolisme des cellules où ils induisent la biosynthèse enzymatique. En effet dans le cas des thiogalactosides, étudié également avec beaucoup de soin, on sait qu'une petite fraction de ces glucides concentrés dans la cellule sont transformés par voie enzymatique en 6-O-acétyl-thiogalactosides (HERZENBERG, Observations inédites ; ZABIN, KEPES et MONOD 1959).

5. ETUDE CINETIQUE DE LA SYNTHÈSE DE LA GLUCURONIDASE CHEZ E. COLI

ML 30

a) La notion de "taux différentiel de synthèse"

La biosynthèse des enzymes est un phénomène complexe résultant de l'interaction coordonnée d'un grand nombre de facteurs. Parmi ceux-ci, les uns sont communs à toutes les synthèses protéiques (synthèse des aminoacides constitutifs, leur activation, réactions génératrices de potentiel énergétique) ; ce sont les facteurs métaboliques. D'autres, les facteurs spécifiques, agissent sélectivement au niveau de la formation d'une protéine donnée (action chimique d'une substance de structure déterminée, l'inducteur, ou action des systèmes génétiques contrôlant la biosynthèse de cet enzyme). Il est donc de première importance de pouvoir séparer sans ambiguïté les rôles joués par chacune de ces deux catégories de facteurs au cours de l'étude cinétique de la biosynthèse d'un enzyme, si l'on veut pouvoir en tirer des conclusions concernant le mécanisme de l'induction enzymatique proprement dite. C'est pourquoi MONOD, PAPPENHEIMER et COHEN-BAZIRE (1952) introduisirent la notion de "taux différentiel de synthèse" que nous définirons ainsi avec eux.*

La masse cellulaire totale x est supposée constituée uniquement de protéines-enzymes $E_1, E_2, E_3 \dots$:

$$E_1 + E_2 + E_3 + \dots = x \quad (1)$$

* TERUI et OKADA (1951) ont formulé indépendamment la même définition.

A chaque instant la vitesse de synthèse totale de la masse cellulaire est égale à la somme des vitesses de synthèse de chaque constituant :

$$\frac{dE_1}{dt} + \frac{dE_2}{dt} + \frac{dE_3}{dt} + \dots = \frac{dx}{dt} \quad (2)$$

Cette vitesse de synthèse de chaque constituant est fonction des divers facteurs métaboliques $m, m', m'' \dots$ d'une part et des divers facteurs spécifiques $s, s', s'' \dots$ d'autre part :

$$\frac{dE_1}{dt} = \varphi(m, m', m'' \dots) f(s_1, s'_1, s''_1, \dots) \quad (3)$$

Si au lieu d'étudier l'accroissement d'un enzyme dE_1 en fonction du temps, on envisage cet accroissement dE_1 par rapport à celui d'un autre constituant cellulaire, dE_2 , les facteurs métaboliques se trouvent éliminés :

$$\frac{dE_1}{dE_2} = \frac{f(s_1, s'_1, s''_1, \dots)}{f(s_2, s'_2, s''_2, \dots)} \quad (4)$$

On préfère généralement comparer l'accroissement d'un constituant dE_1 à l'accroissement total dx :

$$\frac{dE_1}{dx} = \frac{f(s_1, s'_1, s''_1, \dots)}{f(s_1, s'_1, s''_1, \dots) + f(s_2, s'_2, s''_2, \dots) + f(s_3, s'_3, s''_3, \dots) + \dots} = p \quad (5)$$

C'est ce rapport p que MONOD et ses collaborateurs ont appelé "taux différentiel de synthèse". En d'autres termes p est le coefficient exprimant la vitesse de synthèse d'un enzyme comme fraction de la vitesse de synthèse globale des constituants protéiques de la cellule. Dans la pratique, on mesure souvent l'accroissement de masse bactérienne totale dB au lieu de dx , mais cela revient au même pour des cellules en phase de croissance exponentielle.

Ainsi, par définition, toute variation de la valeur de p sous l'influence d'un agent déterminé traduira une modification de l'activité d'un facteur spécifique par rapport à la somme de l'activité des divers facteurs spécifiques. L'emploi de ce paramètre, défini par des considérations théoriques, s'est révélé extrêmement utile dans l'étude de nombreux cas de biosynthèse enzymatique induite et nous allons voir qu'il en va de même pour celui de la glucuronidase d'E. coli. L'étude qui suit a été conduite, par ailleurs, en respectant les conditions de gratuité définies plus haut.

b) Conditions expérimentales de l'étude cinétique

A des temps variés, la densité de la culture bactérienne induite (en croissance exponentielle sur glycérol, sauf mention contraire) était mesurée par spectrophotométrie. Simultanément des échantillons de la culture étaient prélevés, versés dans des tubes à 0°C contenant de la chloromycétine à 50 $\mu\text{g/ml}$ ^{*} et aussitôt désintégrés à l'oscillateur sonique pour la détermination des activités. Dans certains cas, il était nécessaire de calculer l'inhibition de la vitesse d'hydrolyse du PPU due à la présence d'autres glucuronides (inducteurs) dans le milieu et d'effectuer la correction d'activité correspondante.

c) Allure cinétique générale de l'induction de la glucuronidase chez ML30.

La cinétique de l'induction de la glucuronidase dans une culture de ML30 additionnée de méthyl- β -glucuronide (MU) 5.10^{-3}M est représentée de trois manières différentes dans les fig. 1, 2 et 3.

1°) fig. 1: accroissement ΔE d'activité enzymatique en fonction du temps. La cinétique d'allure autocatalytique obtenue s'explique aisément par le fait que dans une culture exponentielle la vitesse de synthèse globale des constituants cellulaires s'accroît autocatalytiquement

* Concentration suffisante pour arrêter toute synthèse ultérieure d'enzyme, ainsi qu'on le verra plus loin.

avec le temps. Il ne s'agit donc pas ici forcément d'une propriété spécifique du processus d'induction.

2°) Fig. 2 : Accroissement d'activité glucuronidasique spécifique A (unité d'enzyme par unité de poids sec bactérien) en fonction du temps. Il en résulte une cinétique exponentielle de la forme $A = \frac{E}{B} = p (1 - e^{-\mu t})$ (E = activité enzymatique, B = masse bactérienne, t = temps, p et μ constantes), semblant caractériser une réaction d'ordre 1 (monomoléculaire).

3°) Fig. 3 : Accroissement ΔE d'activité enzymatique par unité de volume de la culture en fonction de l'accroissement ΔB de masse bactérienne par unité de volume (à partir du moment de l'addition de l'inducteur). Après une période de latence de 30 mn environ[•], on constate l'apparition d'une relation presque immédiatement linéaire entre ΔE et ΔB (après une phase d'accélération initiale à peine discernable) (fig. 3, courbe A).

En d'autres termes, le taux différentiel de synthèse $\frac{\Delta E}{\Delta B} = p$ atteint presque d'emblée une valeur maximum qui reste constante pendant toute la durée de l'expérience (soit plus de 3 générations bactériennes). Dès que l'on supprime l'inducteur (courbe B), le taux de synthèse devient très vite nul ; l'enzyme formé est stable et se dilue simplement dans la masse bactérienne croissante.

Cette cinétique remarquablement simple signifie que la capacité de synthétiser la glucuronidase est constamment proportionnelle à la vitesse de synthèse globale des constituants cellulaires. On en conclut en outre que la synthèse de l'enzyme n'a lieu qu'en présence de son inducteur, commençant presque dès son addition dans le milieu de culture (dans certains cas, le taux est immédiatement linéaire et s'extrapole au moment de l'addition de l'inducteur - voir plus loin fig. 8) et cessant aussitôt que cet inducteur disparaît.

• Temps de doublement de la masse bactérienne : 75 mn.

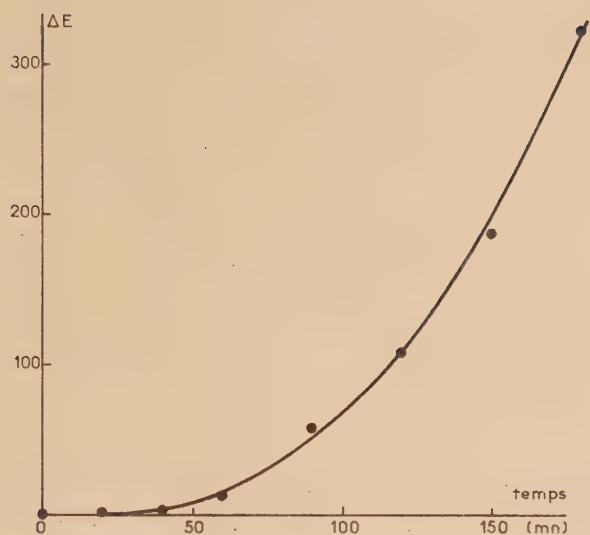


Fig. VI - 1

CINETIQUE DE L'INDUCTION DE LA GLUCURONIDASE (ACCROISSEMENT
D'ACTIVITE ENZYMATIQUE EN FONCTION DU TEMPS) .

(ΔE = accroissement d'activité enzymatique totale, exprimée en $m \mu$ moles de PPU hydrolysé $\times h^{-1} \times ml^{-1}$ de suspension bactérienne).

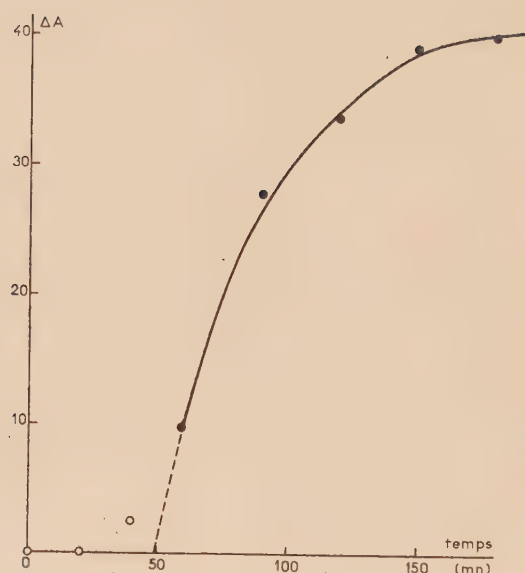


Fig. VI - 2

CINETIQUE D'INDUCTION DE LA GLUCURONIDASE (ACCROISSEMENT

D'ACTIVITE SPECIFIQUE EN FONCTION DU TEMPS)

(ΔA = accroissement d'activité enzymatique spécifique, exprimé en $m \mu$ moles de PPU hydrolysé $\times mn^{-1} \times g^{-1}$ de poids sec bactérien).

Les points  correspondent à la synthèse à taux différentiel constant, et les points  à la latence et à l'accélération du taux de synthèse (voir fig. 3).

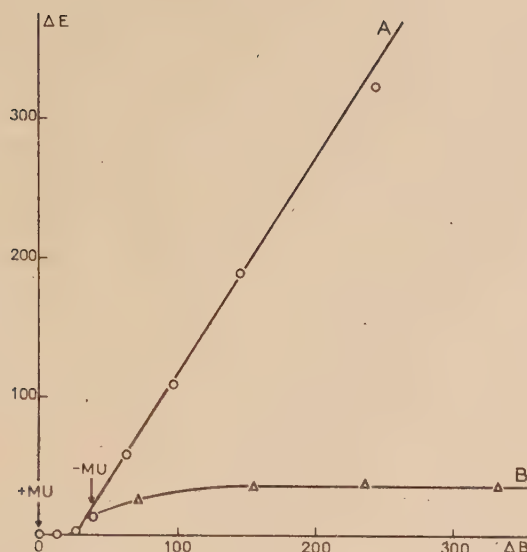


Fig. VI - 3

CINETIQUE D'INDUCTION DE LA GLUCURONIDASE CHEZ ML30 EN PRESENCE
ET EN L'ABSENCE D'INDUCTEUR (TAUX DIFFERENTIEL DE SYNTHESE).

Une culture exponentielle de la souche ML30 sur glycérol (2 mg/ml) était induite par MU $5.10^{-3}M$. Après un doublement la moitié de la culture était centrifugée, le culot bactérien lavé dans un volume égal de milieu 63, centrifugé à nouveau et remis en suspension dans un volume égal de milieu 63 à 2 mg/ml de glycérol et sans inducteur. L'autre moitié de la culture servait de témoin d'induction.

—○—○—○— fraction de suspension témoin avec MU $5.10^{-3}M$.

—△—△—△— fraction de la même suspension, après enlèvement du MU.

ΔE = accroissement d'activité enzymatique par unité de volume de la culture ; exprimé comme sur toutes les fig. suivantes, en $m \mu$ moles de PPU hydrolysé x heure $^{-1}$ x ml $^{-1}$ de suspension bactérienne

ΔB = accroissement de masse bactérienne par unité de volume de la culture ; exprimé, comme sur toutes les fig. suivantes, en μg de poids sec bactérien x ml $^{-1}$ de suspension bactérienne.

Ajoutons que ces expériences respectent, selon toute vraisemblance, la condition de gratuité. Bien que le MU soit métabolisable, le glycérol est cependant bien plus vite utilisé par les cellules (taux de croissance $\approx 0,8$ à $0,9$ pour le glycérol contre $0,6$ pour le MU) et on ne constate aucun changement du taux de croissance au moment de l'addition du MU. De plus, le MU n'est guère dégradé au début de l'expérience, car la quantité de glucuronidase est relativement faible et la vitesse d'hydrolyse du MU peu élevée.

d) Comparaison du taux différentiel de la synthèse induite par divers glucuronides

Nous avons comparé le pouvoir inducteur, à concentration égale ($5.10^{-3}M$) des 5 glucuronides suivants : méthyl- β -D-glucuronide (MU), méthyl- β -D-thioglucuronide (TMU), éthyl- β -D-thioglucuronide (TEU), n-propyl- β -D-thioglucuronide (TPrU) et phényl- β -D-thioglucuronide (TPU). La fig. 4 permet de comparer les taux différentiels correspondant aux divers glucuronides.

On constate que dans tous les cas, après une période de latence et d'accélération plus ou moins prononcée (nulle pour le TPU^e), le taux différentiel se fixe à une valeur maximum constante. Ce taux, c'est-à-dire la pente $\frac{dE}{dB}$ des portions linéaires des fonctions $E = f(B)$, est très variable d'un glucuronide à l'autre pour la même concentration externe de $5.10^{-3}M$ (tableau 4). Si l'on prend pour mesure du pouvoir inducteur le taux différentiel de synthèse stable à la concentration considérée, on voit que le MU et le TMU sont de très bons inducteurs, alors que le pouvoir inducteur du TPrU, du TEU et du TPU est nettement plus faible. Remarquons cependant que le pouvoir inducteur peut varier notablement avec la concentration d'inducteur (voir plus loin). Parmi les 4 inducteurs pour lesquels nous avons étudié cette variation (MU, TEU, TPrU, TPU) seuls le MU et le TPrU donnaient un taux de synthèse maximum à $5.10^{-3}M$; celui du TEU et du TPU par contre augmente quand on passe à la concentration externe de $10^{-2}M$ (tableau 5).

e Plus visible sur la fig. 8.

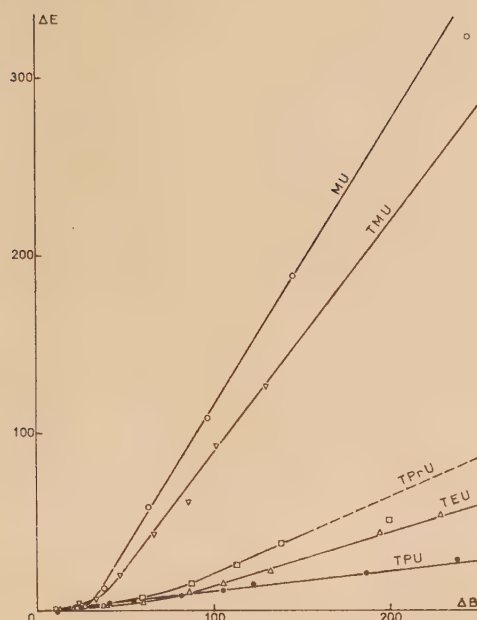


Fig. VI - 4

COMPARAISON DES TAUX DIFFERENTIELS DE SYNTHÈSE DE LA GLUCURONIDASE
POUR DIVERS GLUCURONIDES INDUCTEURS ($5 \cdot 10^{-3}$ M) (ML 30) .

TABLEAU VI- 4

COMPARAISON DES POUVOIRS INDUCTEURS DE DIVERS GLUCURONIDES ($5 \cdot 10^{-3} M$)
VIS-A-VIS DE LA GLUCURONIDASE CHEZ ML30

Inducteurs	Taux différentiel de synthèse ($\Delta E / \Delta B$) (m μ moles de PPU hydrolysé $\times h^{-1} \times mg^{-1}$ de poids sec bac- térien)	Taux différentiel de synthèse relatif
M U	1620	100
T M U	1310	81
T P r U	445	27
T E U	310	19
T P U	115	7

TABLEAU VI - 5

NIVEAU MAXIMUM DE GLUCURONIDASE INDUITE CHEZ ML30 PAR DIVERS GLUCURONIDES

Inducteurs	Concentration maximum essayée respectivement concentration saturante.	Taux différentiel de synthèse ($\Delta E / \Delta B$) (μ moles PPU hydrolysé $\times h^{-1} \times mg^{-1}$ de poids sec bactérien)	Taux différentiel de synthèse relatif
M U	$5.10^{-3} M$ saturant	1620	100
T E U	$10^{-2} M$	455	28
T P r U	$5.10^{-3} M$ saturant	445	27
T P U	$10^{-2} M$	207	13

On voit que d'une manière générale - et d'après les données expérimentales dont nous disposons, c'est-à-dire dans la zone de concentration $10^{-2} M$ à $5.10^{-3} M$ - le pouvoir inducteur semble décroître au fur et à mesure que la taille de l'aglycone augmente. Remarquons que cette conclusion diffère - en ce qui concerne les thioglucuronides tout au moins - de celle que l'on aurait pu tirer des données "semi-quantitatives" figurant au tableau 1 (portant, il est vrai, sur une zone de concentration d'inducteur différente).

e) Variation du pouvoir inducteur en fonction de la concentration d'inducteur.

Nous avons cherché à voir comment variait le taux différentiel de synthèse en fonction de la concentration externe d'inducteur. Les fig. 5, 6, 7, et 8 nous montrent cette variation pour le MU, le TPrU, le TEU et le TPU respectivement. L'examen de ces figures ne permet pas d'établir une loi cohérente d'ensemble régissant la variation du taux différentiel en fonction de la concentration d'inducteur. Notons en passant que les résultats sont parfaitement reproductibles d'une expérience à l'autre.

Pour le MU (fig. 5 et tableau 6), on constate que l'activité induite apparaît après une certaine phase de latence : environ 30 mn en moyenne après l'addition de MU $5 \cdot 10^{-3} M$, mais cette donnée varie un peu d'une expérience à l'autre. Ce temps de latence semble du reste augmenter quand la concentration externe de MU diminue. On remarque par ailleurs une phase préliminaire d'accélération du taux de synthèse, avec une accélération initiale (pente à l'origine) d'autant plus faible que la concentration d'inducteur est plus basse. Ensuite le taux différentiel se stabilise plus ou moins rapidement à une valeur maximum constante à peu près identique pour toutes les concentrations à partir de $5 \cdot 10^{-4} M$ et au-dessus.

On peut donc dire pratiquement qu'à partir de cette valeur l'activité du système formateur d'enzyme - mesurée par le taux différentiel stabilisé - est saturée chez ML30. Par contre en dessous de $5 \cdot 10^{-4} M$ le pouvoir inducteur de MU décroît rapidement et s'annule pratiquement vers $10^{-4} M$. Il faut dire qu'en dessous de $5 \cdot 10^{-4} M$ la durée nécessairement limitée des expériences ne permet pas de dire si le taux est effectivement stabilisé à sa valeur maximum et linéaire ou si l'on a affaire à une accélération infiniment faible. On ne peut attribuer aucune formulation mathématiquement simple à la loi de saturation observée ici, et en particulier il ne s'agit pas d'une saturation conforme à une isotherme d'adsorption de LANGMUIR[•].

• A l'encontre de ce qui a été constaté pour l'induction de la β -glucosidase chez la levure par exemple (DUERKSEN et HALVORSON 1959).

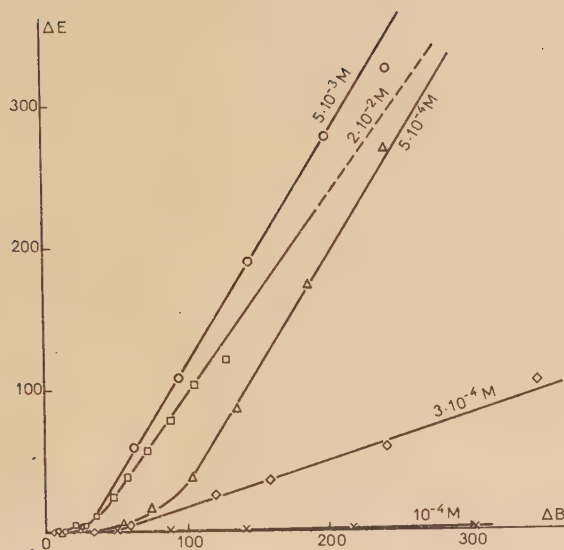


Fig. VI - 5

TAUX DIFFERENTIEL DE SYNTHÈSE DE LA GLUCURONIDASE INDUITE
PAR LE MU à DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS (ML30)

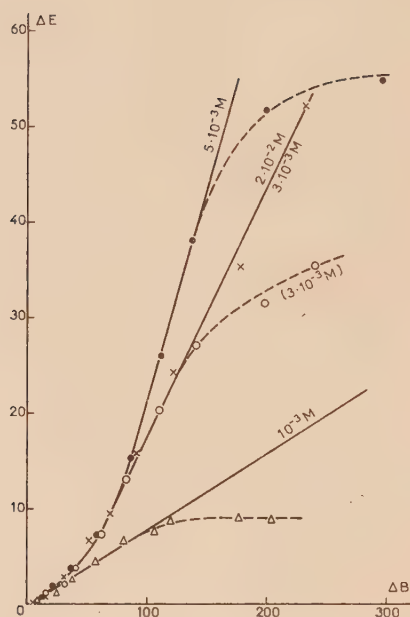


Fig. VI - 6

TAUX DIFFERENTIEL DE SYNTHÈSE DE LA GLUCURONIDASE INDUITE
PAR LE TPrU à DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS (ML 30)

— x — x — x —	TPrU	$2 \cdot 10^{-2} M$
— ● — ● — ● —	—	$5 \cdot 10^{-3} M$
— ○ — ○ — ○ —	—	$3 \cdot 10^{-3} M$
— △ — △ — △ —	—	$10^{-3} M$)

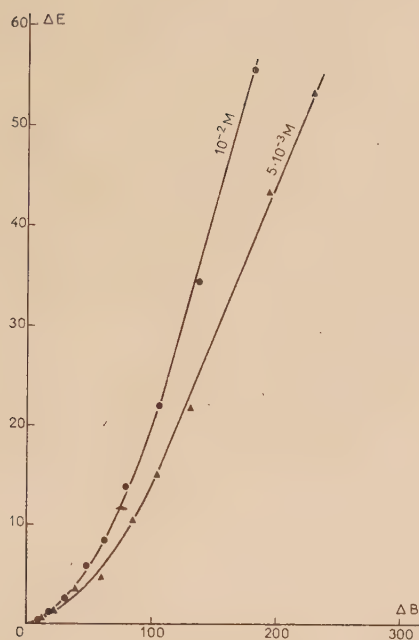


Fig. VI - 7

TAUX DIFFERENTIEL DE SYNTHÈSE DE LA GLUCURONIDASE INDUITE
PAR LE TEU à DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS (ML 30)

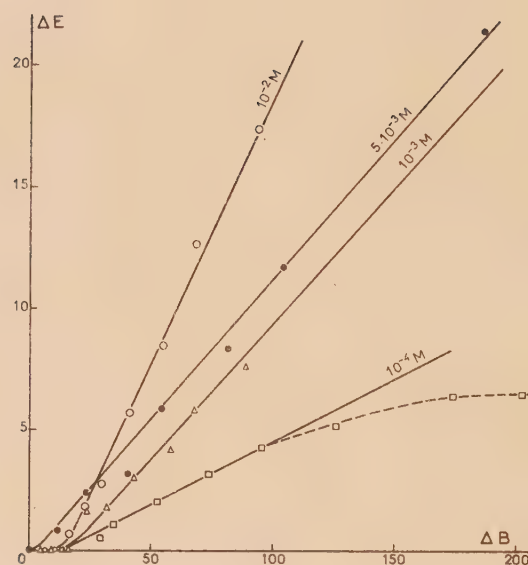


Fig. VI - 8

TAUX DIFFERENTIEL DE SYNTHÈSE DE LA GLUCURONIDASE INDUITE

PAR LE TPU à DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS (ML30)

TABLEAU VI - 6

TAUX DIFFERENTIELS DE SYNTHÈSE "STABLES" DE LA GLUCURONIDASE INDUITE PAR
LE MU A DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS
(ML30)

Concentrations de MU ajouté dans le milieu	Taux différentiel de synthèse $\Delta E / \Delta B$ en $m\mu^{-1}$ moles de PPU hydrolysé $\times h^{-1} \times mg^{-1}$ de poids sec bactérien	Taux différentiel de synthèse relatif
$2 \cdot 10^{-2} M$	1400	87
$5 \cdot 10^{-3} M$	1620	100
$5 \cdot 10^{-4} M$	1620	100
$3 \cdot 10^{-4} M$	320	20
$10^{-4} M$	< 10	$< 0,7$

Considérons maintenant le cas du TPrU, assez nettement différent de celui du MU (fig. 6 et tableau 7). On observe ici encore un effet de saturation du taux différentiel de synthèse, mais cette fois avec un maximum à $5 \cdot 10^{-3} M$ (à $2 \cdot 10^{-2} M$ et $3 \cdot 10^{-3} M$ valeurs réduites à 59 % du taux maximum observé). La loi de saturation ici non plus n'est pas conforme à une isotherme de LANGMUIR, au contraire, entre $10^{-3} M$ et $5 \cdot 10^{-3} M$ il y a rigoureusement proportionnalité entre le taux de synthèse et la concentration d'inducteur. Remarquons qu'ici aussi existe une nette phase d'accélération initiale, cette fois identique dans tous les cas, avec un temps de latence de l'induction pratiquement nul.

TABLEAU VI - 7

TAUX DIFFERENTIELS DE SYNTHÈSE "STABLES" DE LA GLUCURONIDASE INDUITE PAR
LE TPrU à DIFFÉRENTES
CONCENTRATIONS (ML30)

Concentrations de TPrU ajouté dans le milieu	Taux différentiel de synthèse $\Delta E / \Delta B$ en $m\mu$ moles de PPU hydrolysé $\times h^{-1} \times mg^{-1}$ de poids sec bactérien	Taux différentiel de synthèse relatif
$2 \cdot 10^{-2} M$	262	59
$5 \cdot 10^{-3} M$	445	100
$3 \cdot 10^{-3} M$	262	59
$10^{-3} M$	81	18

En ce qui concerne le TEU, nous ne disposions pas d'une assez grande quantité de ce corps pour effectuer de nombreux essais. On voit néanmoins (fig. 7 et tableau 8) qu'à $10^{-2} M$ on n'a pas encore atteint la saturation du pouvoir inducteur. Il y a ici encore une phase d'accélération initiale du taux de synthèse ; la pente à l'origine semble plus grande à $10^{-2} M$ qu'à $5 \cdot 10^{-3} M$ (dans les limites de précision de nos points expérimentaux). De même que pour le TPrU, le temps de latence de l'induction est négligeable.

TABLEAU VI - 8

TAUX DIFFERENTIELS DE SYNTHÈSE "STABLES" DE LA GLUCURONIDASE INDUITE PAR
LE TEU à DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS (ML30)

Concentrations de TEU ajouté dans le milieu	Taux différentiel de syn- thèse $\Delta E / \Delta B$ en $m\mu$ moles de PPU hydrolysé $\times h^{-1} \times$ mg^{-1} de poids sec bacté- rien.	Taux différentiel de synthèse relatif.
$10^{-2} M$	455	100
$5.10^{-3} M$	310	68

Enfin le cas du TPU est un peu aberrant sous certains aspects (fig. 8 et tableau 9). Entre $5.10^{-3} M$ et $10^{-3} M$, il y a un net palier de satura-
tion du pouvoir inducteur, et seule change d'aspect la phase initiale : le temps de latence est pratiquement nul à $5.10^{-3} M$, mais il est important à $10^{-3} M$ (environ 1 h). Au-dessous de cette valeur, on arrive dans la zone de non saturation du pouvoir inducteur ; mais paradoxalement, au-dessus de $5.10^{-3} M$, le taux de synthèse, après le palier de saturation, augmente à nouveau très nettement. Fait plus étrange encore, la période de latence réapparaît quoique moins prononcée qu'à $10^{-3} M$. La phase d'accélération du taux de synthèse est ici négligeable, le taux linéaire étant rapidement atteint. Il n'y a à aucun moment proportionnalité entre la concentration externe d'inducteur et le taux de synthèse linéaire ; on observe au contraire l'existence d'une loi complexe de saturation avec palier intermédiaire, qui n'affecte pas non plus la forme d'une isotherme d'adsorption.

TABLEAU VI - 9

TAUX DIFFERENTIELS DE SYNTHÈSE "STABLES" DE LA GLUCURONIDASE INDUITE
PAR LE TPU A DIFFERENTES CONCENTRATIONS (ML30)

Concentrations de TPU ajouté dans le milieu	Taux différentiel de syn- thèse $\Delta E / \Delta B$ en m / μ moles de PPU hydrolysé $\times h^{-1} \times$ mg^{-1} de poids sec bacté- rien	Taux différentiel de synthèse relatif
$10^{-2} M$	207	100
$5 \cdot 10^{-3} M$	115	55
$10^{-3} M$	115	55
$10^{-4} M$	52	25

L'analyse détaillée de la variation du taux différentiel de synthèse en fonction de la concentration externe des divers inducteurs permet de définir deux paramètres distincts caractérisant le pouvoir inducteur (BUTTIN 1955) :

1°) L'"activité inductrice" caractérisée par la pente maximum du taux différentiel de synthèse stabilisé, obtenu lorsque le système d'induction est saturé.

2°) L'"affinité inductrice" caractérisée par la rapidité avec laquelle le taux différentiel de synthèse diminue, en dessous de la zone de saturation, lorsque la concentration externe d'inducteur baisse. On

pourrait la définir par la valeur de la concentration d'inducteur donnant un taux différentiel égal à la moitié du taux différentiel à saturation (ou plus exactement par l'inverse de cette concentration).

Nous avons déjà eu l'occasion de comparer les taux différentiels de synthèse de la glucuronidase induite par divers glucuronides à la concentration de 5.10^{-3} M (tableau 4). Pour trois d'entre eux, le MU, le TPrU et le TPU^e, cette concentration est pratiquement saturante et l'on peut donc classer ainsi ces corps par ordre d'"activité inductrice" décroissante :

méthyl- β -glucuronide
 propyl- β -thioglucuronide
 phényl- β -thioglucuronide

Quant à l'"affinité inductrice" nos données expérimentales ne permettent pas de la chiffrer avec précision. L'examen du tableau 10 nous permet cependant d'évaluer qualitativement cette affinité par la rapidité de décroissance du taux différentiel en dessous de la saturation ; à 5.10^{-3} M le TEU ne sature déjà plus le système inducteur, et à 10^{-3} M, le TPrU n'induit plus la glucuronidase qu'à un taux différentiel inférieur à 20 % du taux de saturation alors que, à la même concentration le MU et le TPU sont encore "saturants". Enfin, à 10^{-4} M, la valeur du taux différentiel avec le TPU est encore près de la moitié du taux à saturation, alors que pour le MD il est devenu nul.

On peut donc classer grossièrement ainsi, les quatre glucuronides suivants par ordre d'"affinité inductrice" décroissante :

^e Si toutefois on ne tient pas compte de l'augmentation du taux différentiel au-delà de 5.10^{-3} M après un palier effectif de saturation.

TABLEAU VI - 10

COMPARAISON DES "AFFINITES INDUCTRICES" DES DIVERS INDUCTEURS DE LA
GLUCURONIDASE CHEZ E. COLI ML 30'

Inducteurs	$5.10^{-3}M$	$10^{-3}M$	$3.10^{-4}M$	$10^{-4}M$
MU	1620 (100%)	1620 (100%)	320 (20%)	< 10 (< 0,7 %)
T P r U	445 (100%)	81 (18%)	-	-
T E U	310 (non saturé 68% du taux maximum ob- servé) •	-	-	-
T P U	115 (100%) ••	115 (100%) ••	-	52 (45%) ••

Les chiffres indiqués sont les taux différentiels de synthèse "stables" exprimés en $m\mu$ moles de PPU hydrolysé $\times h^{-1} \times mg^{-1}$ de poids sec bactérien.

Entre parenthèses le pourcentage par rapport au taux différentiel à saturation.

- Obtenu à $10^{-2}M$, sans que l'on puisse préciser s'il s'agit de taux à saturation ou non,
- En ne tenant pas compte de l'augmentation "aberrante" du taux de synthèse différentiel observé au-delà de $5.10^{-3}M$.

phényl- β -thioglucuronide
 méthyl- β -glucuronide
 propyl- β -thioglucuronide
 éthyl- β -thioglucuronide

On pourrait penser que l'"affinité inductrice" d'un glucuronide est simplement le reflet de son affinité pour le système accumulateur des glucuronides (perméase) décrit au chap. V. Il ne semble pas cependant que les choses soient aussi simples, car le classement par ordre d'"affinité inductrice" décroissante ne se superpose pas entièrement avec le classement de ces glucuronides par ordre d'affinité décroissante pour la perméase (tel qu'il découle du tableau 10 du chap. V, p. 110) :

phényl- β -thioglucuronide
 propyl- β -thioglucuronide
 méthyl- β -glucuronide

On constate par ailleurs que les deux types de paramètres, activité et affinité inductrices, ne varient pas de manière parallèle pour une modification donnée de la structure de l'aglycone (contrairement à ce qui a été observé pour la galactosidase d'E. coli avec les thiogalactosides par BUTTIN en 1955).

f) Conclusion : interprétation générale de la cinétique d'induction de la glucuronidase chez E. coli ML 30 .

Si les effets quantitatifs varient d'un inducteur à l'autre, nous avons pu nous convaincre que la cinétique d'induction de la glucuronidase était essentiellement caractérisée par la constance du taux différentiel de synthèse, c'est-à-dire par la proportionnalité entre l'accroissement de l'activité enzymatique et l'accroissement de la masse protéique totale. Cette relation est vérifiée dans la plupart des cas (celui de TPrU mis à part, voir fig. 6) pendant au moins 2 ou 3 doublements de la masse bactérienne (plus de 5 doublements au moins pour le TPU $5.10^{-3}M$, voir fig. 8).

Mais la façon dont ce taux linéaire est atteint à partir du moment de l'addition de l'inducteur, varie suivant les cas. Pour le TPU $5.10^{-3}M$ il n'y a pas de temps de latence et le taux de synthèse est d'emblée linéaire. Dans les autres cas, nous avons constaté un temps de latence plus ou moins long dans l'apparition de l'activité induite, ainsi qu'une période d'accélération plus ou moins prononcée du taux de synthèse précédant l'instauration du régime linéaire. Nous avons d'autre part remarqué que, pour le MU tout au moins, l'accélération initiale est d'autant plus faible que la concentration d'inducteur est plus basse.

MONOD, PAPPENHEIMER et COHEN-BAZIRE (1952) ont analysé avec soin la signification qu'il convient d'attacher à l'allure du taux différentiel de synthèse. Ils attirent l'attention sur le fait que ce n'est pas la constance elle-même du taux de synthèse qui est l'élément essentiel, celui-ci devant nécessairement tendre vers une valeur constante au sein d'une population cellulaire homogène en état d'équilibre, c'est-à-dire où les constituants sont synthétisés en proportions constantes. Par contre la manière dont ce taux différentiel devient constant, dont il évolue de la valeur 0 (au moment de l'addition de l'inducteur) à la valeur stable, est du plus grand intérêt théorique.

Les hypothèses variées postulant que la biosynthèse enzymatique induite résulte de la conversion réversible précurseur $\rightleftharpoons$ enzyme (YUDKIN 1938, SPIEGLEMAN 1946, MONOD 1947) entraînent la prédiction que le taux de synthèse d'un enzyme induit ne peut être linéaire d'emblée, mais doit inévitablement être plus élevé au début et atteindre une valeur stable après une phase d'accélération négative. Au contraire, pour un système doué de propriétés autocatalytiques (SPIEGELMAN 1946, HINSHELWOOD 1946, MONOD 1949^a), le taux de synthèse doit augmenter graduellement avant de se fixer à sa valeur stable.

Or, pour la glucuronidase, de même que pour la galactosidase (MONOD, PAPPENHEIMER et COHEN-BAZIRE 1952), le taux de synthèse est immédiatement linéaire pour le TPU (surtout à $5.10^{-3}M$) et pratiquement aussi pour le MU à $5.10^{-3}M$ (si l'on fait abstraction de la période de latence où aucune

activité ne se manifeste). Dans les autres cas on constate une phase d'accélération positive, mais jamais négative. L'hypothèse de la conversion réversible d'un précurseur en enzyme au cours de l'induction se trouve donc écartée pour la glucuronidase comme pour la galactosidase (MONOD et coll. loc. cit.) . L'enzyme formé est du reste stable puisque, comme nous l'avons vu, l'activité enzymatique demeure invariable après élimination de l'inducteur et est simplement diluée peu à peu par la masse bactérienne en train de croître. Ceci va également à l'encontre de l'hypothèse de la réversibilité du phénomène de l'induction.

En fait le taux de synthèse immédiatement linéaire prouve que la vitesse de formation de l'enzyme induit est indépendante de la teneur des cellules en enzyme et aussi de la masse totale des cellules, et qu'elle ne dépend que de l'accroissement de cette masse. Ceci suggère fortement que lorsque le processus d'induction se déclenche, c'est une protéine nouvelle, inexistante auparavant, qui est synthétisée, dès le début à son taux maximum. En d'autres termes, l'induction ne semble pas résulter d'une réorganisation, même partielle, des protéines préexistantes.

La phase d'accélération initiale plus ou moins marquée du taux différentiel de synthèse peut s'interpréter de différentes façons. On pourrait penser que l'inducteur interne réel n'est pas le MU par exemple, mais un produit de "transglucuronidation" de celui-ci. La phase d'accélération dans l'induction traduirait alors le temps nécessaire à l'apparition progressive de cet inducteur transglucuronidé. Cependant, cette période d'accélération existe également avec les thioglucuronides qui, non hydrolysables ni transformés chimiquement au cours de l'induction, semblent peu susceptibles de subir une transglucuronidation.

On pourrait aussi attribuer la période d'accélération initiale au fait qu'une activation préliminaire de l'inducteur- quelle qu'elle soit - serait nécessaire. Mais nous verrons plus loin que lorsqu'on débarrasse durant un certain temps de son inducteur une culture préalablement induite, la synthèse de la glucuronidase s'arrête. Dès qu'on y rajoute un inducteur, la synthèse enzymatique se déclenche de façon immédiatement

linéaire, sans aucune espèce de phase de latence ni d'accélération. Il en résulte que l'hypothèse de l'activation préalable de l'inducteur est peu vraisemblable, ainsi du reste que celle de la transglucuronidation.

Il faut probablement plutôt imputer l'existence de ce processus d'accélération initiale à la pénétration progressive de l'inducteur dans la cellule sous l'influence de la perméase en cours de synthèse. Le produit de l'activité de celle-ci, l'inducteur intracellulaire de la glucuronidase, étant selon toute vraisemblance en même temps l'inducteur de cette perméase, il est logique que la synthèse de celle-ci et par contre-coup celle de la glucuronidase, prennent au début une allure autocatalytique. Nous reviendrons du reste ultérieurement plus en détail sur ce point.

6. INHIBITION DE LA BIOSYNTHESE INDUITE DE LA GLUCURONIDASE CHEZ E. COLI ML30.

Nous avons étudié l'action de deux catégories d'inhibiteurs sur la biosynthèse induite de la glucuronidase : celle des inhibiteurs de la synthèse des protéines en général et celle des inhibiteurs du type glucose.

a) Action des inhibiteurs de la synthèse protéique

L'action de la chloromycétine est traduite par les courbes de la fig. 9. Une culture exponentielle de la souche ML30 sur glycérol est divisée en 2 lots, le lot A servant de témoin (sans addition) et le lot B recevant de la chloromycétine à 50 $\mu\text{g/ml}$. L'inducteur (TPU 5.10^{-3}M) est ajouté 5 minutes plus tard dans les deux cultures. Nous avons reporté sur la fig. 9 d'une part les courbes de croissance A et B en fonction du temps et d'autre part les courbes d'activité glucuronidasique A' et B' (activité totale par unité de volume) en fonction du temps (la représentation du taux différentiel de synthèse n'a ici aucun sens, l'accroissement de masse bactérienne étant pratiquement nul en présence de chloromycétine). On constate que la chloromycétine stoppe immédiatement à peu

près toute croissance bactérienne et qu'elle bloque en même temps pratiquement toute formation induite de glucuronidase : l'activité totale de la culture additionnée de chloromycétine ne représente que 5 % environ de celle de la culture témoin (après 3 doublements de masse de cette culture).

Nous avons également analysé l'influence de trois analogues stériques d'acides aminés, le 5-méthyltryptophane et le tryptazan (analogues du tryptophane) et la β -2-thiénylalanine (analogue de la phénylalanine) d'une part, et celle d'un analogue de base pyrimidique, le 5-fluorouracile (analogue stérique de l'uracile) d'autre part (fig. 10 à 12).

Dans le cas de la fig. 12, une culture exponentielle sur succinate était divisée en trois lots dont un témoin et deux recevant chacun l'un des analogues, fluorouracile ou tryptazan ($50 \mu\text{g/ml}$). L'inducteur ($\text{MU } 10^{-3}\text{M}$) était ajouté 15 minutes plus tard. On constate que si chaque analogue permet une croissance résiduelle linéaire, il bloque par contre pratiquement toute formation d'enzyme.

Les expériences relatives au 5-méthyltryptophane (fig. 10) et à la β -2-thiénylalanine (fig. 11) ont été conduites d'une façon légèrement différente. Une culture exponentielle sur glycérol et induite au taux maximum stable par $\text{MU } 5 \cdot 10^{-3}\text{M}$ était divisée en deux lots, l'un témoin A et l'autre B auquel on ajoutait l'analogue (5-méthyltryptophane : $5 \cdot 10^{-4}$ ou β -thiénylalanine : $2 \cdot 10^{-4}\text{M}$). Ainsi qu'on peut le constater, les deux analogues permettent une croissance résiduelle linéaire. La formation de glucuronidase est immédiatement et fortement inhibée, mais elle n'est pas nulle ; en fin d'expérience (2 doublements de la culture témoin), l'activité dans la culture additionnée de 5-méthyltryptophane ne correspond qu'à 13 % de celle de la culture non traitée, et celle de la culture ayant reçu la β -2-thiénylalanine ne représente que 16 % de l'activité de la culture témoin. Dans les deux cas, on constate une inhibition du taux différentiel de synthèse qui demeure cependant toujours linéaire :

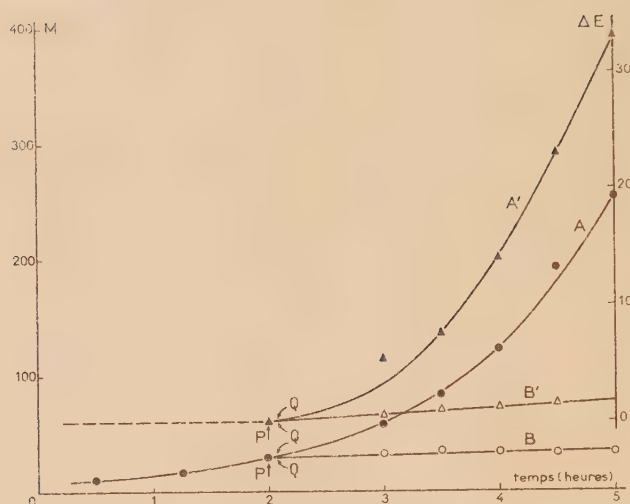


Fig. VI - 9

EFFET COMPARE DE LA CHLOROMYCETINE SUR LA CROISSANCE BACTERIENNE ET LA BIOSYNTHESE INDUITE DE LA GLUCURONIDASE CHEZ E. COLI ML 30.

M = croissance bactérienne, en μg de poids sec bactérien/ml

ΔE = accroissement d'activité glucuronidasique totale, en $m\mu$ moles de PPU hydrolysé $\times h^{-1} \times ml^{-1}$ de suspension bactérienne

A = croissance, sans chloromycétine

B = croissance, avec chloromycétine

A' = glucuronidase, sans chloromycétine

B' = glucuronidase, avec chloromycétine.

Les origines des deux axes d'ordonnée sont décalées l'une par rapport à l'autre, pour des raisons de clarté.

en P = addition de chloromycétine (courbes B et B' seulement)

en Q = addition d'inducteur ($TPU 5 \cdot 10^{-3} M$ partout).

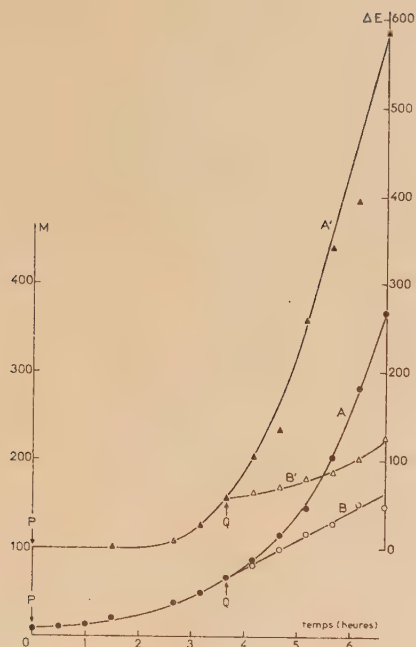


Fig. VI - 10

EFFET COMPARE DE 5-METHYLTRYPTOPHANE SUR LA CROISSANCE BACTERIENNE ET LA BIOSYNTHESE INDUITE DE LA GLUCURONIDASE CHEZ E. COLI ML30.

(M = croissance bactérienne, en μ gde poids sec bactérien/ml

ΔE = accroissement d'activité glucuronidasique totale, en m μ moles de PPU hydrolysé $\times h^{-1} \times ml^{-1}$ de suspension bactérienne.

A = croissance, sans analogue

B = croissance, avec analogue

A' = glucuronidase, sans analogue

B' = glucuronidase, avec analogue.

Les origines des deux axes d'ordonnée sont décalées l'une par rapport à l'autre, pour des raisons de clarté.

en P = addition de l'inducteur ($MU 5.10^{-3} M$)

en Q = addition de l'analogue (courbes B et B' seulement)).

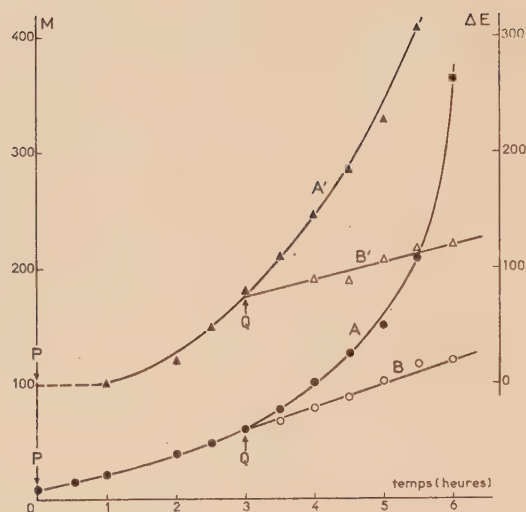


Fig. VI- 11

**EFFET COMPARE DE LA β -2-THIENYLALANINE SUR LA CROISSANCE BACTERIENNE
& LA BIOSYNTHESE INDUITE DE LA GLUCURONIDASE CHEZ E. COLI ML30.**

(M = croissance bactérienne, en μg de poids sec bactérien/ml
 ΔE = accroissement d'activité glucuronidasique totale, en $\text{m}\mu\text{mole}$ de PPU hydrolysé $\times \text{h}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ de suspension bactérienne.

A = croissance, sans analogue

B = croissance, avec analogue

A' = glucuronidase, sans analogue

B' = glucuronidase, avec analogue .

Les origines des deux axes d'ordonnée sont décalées l'une par rapport à l'autre, pour des raisons de clarté.

en P = addition de l'inducteur (MU 5.10^{-3}M)

en Q = addition de l'analogue (courbes B et B' seulement)).

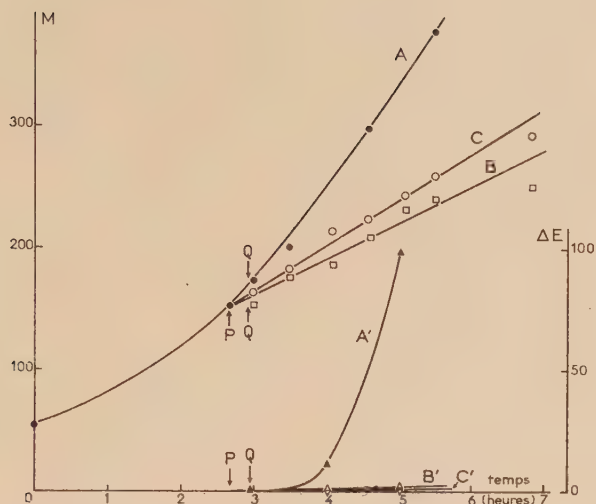


Fig. VI - 12

EFFETS COMPARES DU 5-FLUOROURACILE ET DU TRYPTAZAN SUR LA CROISSANCE BACTERIENNE D'UNE PART ET SUR LA BIOSYNTHESE INDUITE DE LA GLUCURONIDASE D'AUTRE PART (E. coli ML30)

M = croissance bactérienne, en μg de poids sec bactérien/ml

ΔE = accroissement d'activité glucuronidasique totale, en $\text{m}\mu$ moles de PPU hydrolysé $\times \text{h}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ de suspension bactérienne

A = croissance sans analogue

B = croissance avec 5-fluorouracile

C = croissance avec tryptazan

A' = glucuronidase sans analogue

B' = glucuronidase avec 5-fluorouracile

C' = glucuronidase avec tryptazan

en P = addition de l'analogue (sauf courbe A et A')

en O = addition de l'inducteur ($\text{MU } 10^{-3} \text{ M}$, partout)

69 % en présence de 5-méthyltryptophane et 55 % en présence de β -2-thiénylalanine. Cela signifie que l'effet d'inhibition dû à l'analogue, s'il exerce sur toute la croissance et par conséquent sur les synthèses protéiques en général, a cependant une incidence plus forte sur la formation de glucuronidase que sur la moyenne des synthèses protéiques de la cellule. Signalons que l'addition de L-tryptophane ($5 \cdot 10^{-4} M$) lève entièrement l'inhibition de l'induction engendrée par le 5-méthyltryptophane.

Ces résultats, dans leur ensemble, font apparaître une étroite liaison entre la synthèse des protéines en général et la formation induite de la glucuronidase.

L'effet inhibiteur général de la chloromycétine sur la synthèse des protéines chez de nombreux microorganismes est suffisamment connu pour que nous n'ayons pas à y revenir (GALES et FOLKES 1953, MAXWELL et NICKEL 1954, WISSEMAN et SMADEL 1954, BERNLOHR et WEBSTER 1958). On sait que cet effet est sélectif et que la chloromycétine n'empêche pas la synthèse des acides nucléiques, ni les échanges énergétiques. En ce qui concerne les analogues d'acides aminés, il a été démontré que le 5-méthyltryptophane et la β -2-thiénylalanine, tout en permettant une croissance résiduelle linéaire accompagnée d'une synthèse de protéines, empêchaient l'apparition de l'activité de certains enzymes (COHEN et MUNIER 1959). Le 5-méthyltryptophane n'est pas incorporé dans les protéines synthétisées, mais on a toutes raisons de croire que sa présence inhibe la synthèse du tryptophane; quant à la β -2-thiénylalanine, elle est effectivement incorporée dans les protéines synthétisées à la place de la phénylalanine (MUNIER et COHEN 1956 et 1959). Il semble donc que les protéines synthétisées dans ces conditions soient de structure anormale, ce qui entraîne leur inactivité biologique. Des résultats analogues ont été trouvés avec le tryptazan (BRAWERMAN et YCAS 1957 ; PARDEE et PRESTIDGE 1956 et 1958). Enfin HOROWITZ et CHARGAFF (1958 et 1959) ont montré que le 5-fluorouracile s'incorpore dans l'acide ribonucléique ; il s'en suit une inhibition partielle de la synthèse des protéines en général et la formation de certaines activités enzymatiques est supprimée. NAONO et GROS (1960^a) ont de plus

prouvé que les protéines synthétisées en présence de 5-fluorouracile par E. coli sont modifiées électivement dans leur composition en acides aminés et que certains enzymes en particulier sont synthétisés avec une structure modifiée (phosphatase alcaline : NAONO et GROS 1960^b ; β -galactosidase : BUSSARD, NAONO et coll. 1960), entraînant parfois une inactivation partielle de l'enzyme (galactosidase).

Il semble donc à peu près certain que l'induction de la glucuronidase consiste bien en la synthèse de novo d'une molécule protéique à partir de ses éléments constitutifs, les différents aminoacides. On voit mal quel serait autrement le rôle des divers inhibiteurs dont nous venons de parler et qui agissent justement au niveau de cet assemblage des acides aminés en une structure protéique nouvelle[©]. Il serait en particulier difficile d'admettre que leur action s'effectue au niveau de la conversion d'un précurseur protéique de l'enzyme, ou encore de la synthèse d'un effecteur de cet enzyme. Ce résultat s'inscrit du reste dans la ligne générale de ce qui a été démontré dans d'autres cas de biosynthèse enzymatique induite (voir au chapitre I).

b) Influence de la source de carbone "Effet glucose"

Nous avons cherché à savoir quelle pouvait être l'influence de la source de carbone fournie à la culture bactérienne dans le déroulement de la biosynthèse induite de la glucuronidase chez E. coli souche ML30. Dans ce but, nous avons induit par le MU 5.10^{-3} M des cultures bactériennes utilisant comme source de carbone et d'énergie les 4 substrats suivants : glycérol (2 mg/ml), succinate (4 mg/ml), maltose^{©©} (2 mg/ml), glucose

• L'activité glucuronidasique résiduelle induite en présence de 5-méthyltryptophane et de β -2-thiénylalanine peut s'expliquer, soit par une élimination incomplète du tryptophane et de la phénylalanine de certaines molécules synthétisées, soit par l'apparition d'une molécule de structure seulement partiellement modifiée et possédant une activité résiduelle comme dans le cas de certaines protéines "Cz" de structure proche de celle de la galactosidase (PERRIN, BUSSARD et MONOD 1959).

©© Il s'agit de maltose soigneusement recristallisé dans l'alcool à 80° pour le débarrasser de toute trace de glucose.

(1 mg/ml). La fig. 13 nous montre l'allure de l'induction en présence des trois premiers substrats. Le glycérol et le succinate permettent tous deux ; on le voit, une forte induction maximum, alors que celle qui a lieu en présence de maltose est bien plus faible. On peut d'autre part constater une nette différence entre les phases d'accélération du taux de synthèse ; presque nulle pour le glycérol, elle est fort longue avec le succinate et presque équivalente avec le maltose. Le tableau 11 nous permet de comparer le taux de croissance avec le taux différentiel de synthèse de l'enzyme pour une source de carbone donnée : on remarquera que ce sont les 2 substrats sur lesquels la croissance est relativement lente (glycérol et succinate) qui donnent le plus fort taux de synthèse.

En ce qui concerne le glucose, les résultats sont différents. Dans une culture ensemencée sur glucose (1 mg/ml soit environ $5 \cdot 10^{-3} M$) en présence de MU $5 \cdot 10^{-3} M$, la biosynthèse induite de la glucuronidase est totalement bloquée durant toute la phase exponentielle de la croissance (accroissement de masse bactérienne de 370 μg en poids sec, soit 4 doublements) ; et elle le reste au moins pendant les deux heures suivantes au cours de la phase stationnaire occasionnée par l'épuisement du milieu en glucose (fig. 14, courbe A). Si l'on ajoute du glucose ($5 \cdot 10^{-3} M$) à une culture en phase exponentielle sur glycérol et induite au taux maximum par MU ($5 \cdot 10^{-3} M$), on constate une diminution de 50 % environ du taux différentiel de synthèse (fig. 14 courbe D) par rapport à une portion aliquote de cette culture exempte de glucose[•] (fig. 14, courbe C) ; l'inhibition de l'induction, si elle n'est plus totale ici, est tout de même encore très prononcée.

Nous avons déjà eu l'occasion de signaler (chap. I p. 14) que ce

• Si l'on ajoute du glucose à une culture croissant exponentiellement sur glycérol, c'est le glucose qui est utilisé préférentiellement au glycérol restant, ainsi qu'en témoigne le changement instantané du taux de croissance.

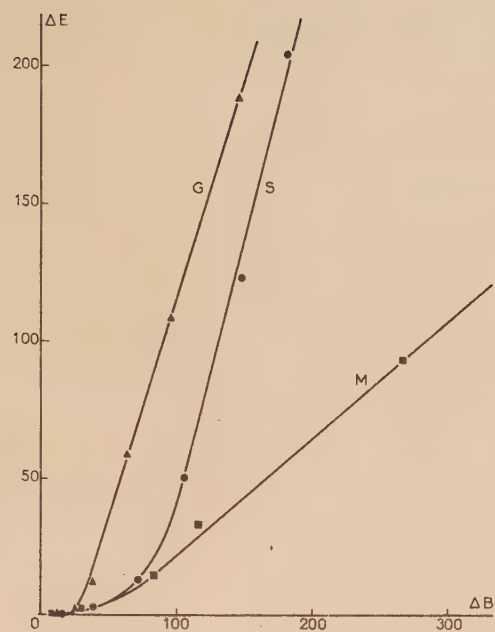


Fig. VI - 13

BIOSYNTHESE DE LA GLUCURONIDASE INDUITE PAR $5 \cdot 10^{-3}$ M EN PRESENCE DE
DIVERSES SOURCES DE CARBONE (ML30)

(G = Glycérol
 S = Succinate
 M = Maltose)

TABLEAU VI - 11

COMPARAISON DES TAUX DE CROISSANCE ET DES TAUX DIFFÉRENTIELS DE SYNTHÈSE
 DE LA GLUCURONIDASE INDUITE PAR LE MU $5 \cdot 10^{-3}$ M CHEZ ML30

Source de carbone	Taux de croissance	Taux différentiel de synthèse de la glucuronidase	
		en μ moles de PPU hydrolysé $\times h^{-1} \times mg^{-1}$ de poids sec bactérien	relatif
succinate	0,8	1990	100
glycérol	0,8	1620	81
maltose	1,0	440	22

• MONOD 1949^b

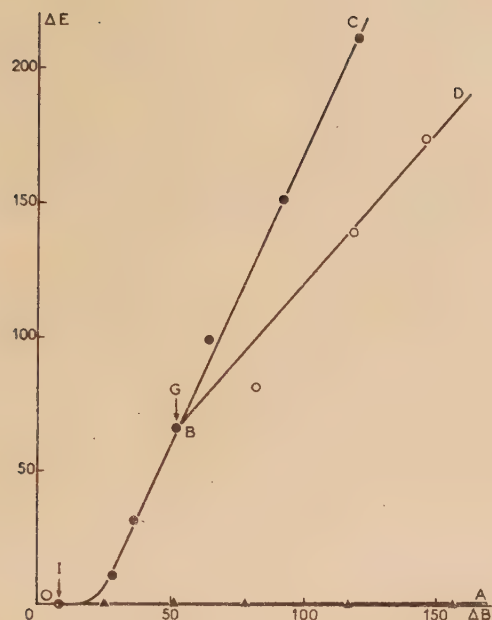


Fig. VI - 14

INHIBITION PAR LE GLUCOSE DE LA BIOSYNTHESE INDUITE DE LA GLUCURONIDASE
(ML30)

courbe O A : glucose $5 \cdot 10^{-3} M$ ajouté en même temps que MU $5 \cdot 10^{-3} M$
(en I)

courbe O B C : culture sur glycérol induite par MU $5 \cdot 10^{-3} M$
(ajouté en I)

courbe B D : fraction de la même culture (préalablement induite
par MU sur glycérol) additionnée de glucose $5 \cdot 10^{-3} M$
(en G)

phénomène d'inhibition de l'induction par le glucose ("effet glucose") était très répandu parmi les enzymes inductibles. La glucuronidase ne fait donc pas exception à cette règle. Nous reviendrons ultérieurement sur l'interprétation qu'il convient de donner à la différence quantitative observée dans l'action du glucose selon que celui-ci est ajouté avec ou après l'inducteur.

7. LE ROLE DE LA GLUCURONIDE-PERMEASE DANS LE PROCESSUS D'INDUCTION DE LA GLUCURONIDASE

Nous avons décrit au chapitre V un système (perméase) capable de concentrer à l'intérieur de la cellule bactérienne les glucuronides du milieu externe. Le taux différentiel de synthèse de la glucuronidase variant largement en fonction de la concentration du glucuronide inducteur ajouté, il semblait évident que la perméase devait exercer une influence prépondérante sur le processus d'induction. Deux types d'expériences ont, en effet, confirmé cette hypothèse.

a) Effet de "préinduction"

Nous avons vu plus haut que le taux différentiel de synthèse de la glucuronidase chez ML30 pouvait varier de façon notable en fonction de la concentration externe en inducteur. Ainsi, avec le MU, au-dessus de $5.10^{-4}M$ on se trouve dans la zone de saturation du pouvoir inducteur ; au-dessous de cette limite, par contre, le taux de synthèse baisse rapidement. Mais il en va tout autrement pour des bactéries préalablement induites au maximum, puis débarrassées de leur inducteur (bactéries "pré-induites"), (fig.15). Lorsqu'on induit pleinement une culture de ML30 par le MU ($5.10^{-3}M$), qu'on lave les cellules par centrifugation pour éliminer l'inducteur et qu'on les remet en suspension dans un milieu nutritif neuf additionné de $MU.3.10^{-4}M$, on constate que les bactéries synthétisent d'emblée la glucuronidase au taux maximum. Celui-ci est comparable à celui d'une culture non "préinduite" et croissant en présence d'inducteur en concentration saturante ($5.10^{-3}M$) et plus de 7 fois supérieur au taux de synthèse d'une culture non préinduite se développant en présence

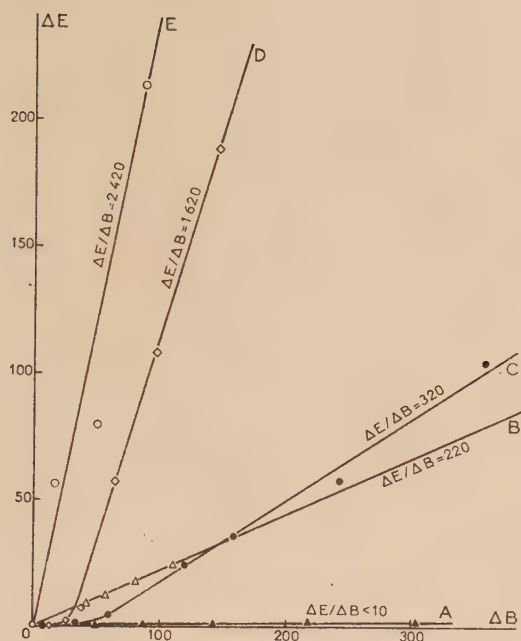


Fig. VI - 15

EFFET DE "PREINDUCTION" DANS LA BIOSYNTHESE INDUITE DE LA GLUCURONIDASE
(ML30)

courbe O A : culture induite par MU 10^{-4} M (non préinduite)
 O B : " " 10^{-4} M (préinduite)
 O C : " " $3 \cdot 10^{-4}$ M (non préinduite)
 O D : " " $5 \cdot 10^{-3}$ M (non préinduite)
 O E : " " $3 \cdot 10^{-4}$ M (préinduite)

de MU à la concentration de $3 \cdot 10^{-4} M$. A une concentration externe de $10^{-4} M$ en MU, pratiquement non inductrice chez une suspension non préalablement induite, une culture préinduite synthétise encore l'enzyme à un taux appréciable (14 % du taux à saturation). Tout se passe donc comme si une induction préalable rendait les cellules beaucoup plus sensibles aux faibles concentrations d'inducteurs.

Cet "effet de préinduction" ne peut pas être dû à une certaine quantité d'inducteur de la phase préalable qui serait partiellement retenu par les cellules malgré le lavage ; nous avons vu (fig. 3) que cette opération entraînait l'arrêt presque instantané et définitif de la biosynthèse induite. L'explication la plus simple et la plus logique est que ce phénomène constitue une manifestation des propriétés d'induction et de fonctionnement de la glucuronide-perméase. Celle-ci est en effet inducible par le MU comme la glucuronidase elle-même et il est vraisemblable que c'est le glucuronide intracellulaire qui l'induit ; cela est pratiquement certain dans le cas analogue de la galactoside-perméase (MONOD 1956, RICKENBERG, COHEN, BUTTIN et MONOD 1956, NOVICK et WEINER 1957, COHN et HORIBATA 1959^a). Autrement dit, la perméase est induite par le propre produit de sa réaction et son induction doit revêtir une allure autocatalytique (jusqu'à ce qu'on ait atteint la vitesse de synthèse maximum). Comme la concentration intracellulaire d'inducteur augmente exponentiellement au début, ceci entraîne automatiquement une phase d'accélération dans la vitesse de synthèse de la glucuronidase. Or c'est précisément ce que nous avons constaté avec le MU et la plupart des autres glucuronides pour une concentration suffisamment basse d'inducteur. D'autre part, cette phase d'accélération est d'autant plus prononcée que la concentration externe d'inducteur est plus faible. En effet, aux faibles concentrations d'inducteur la perméase est de plus en plus lentement induite, parce que, pour une cellule donnée, la chance qu'une première molécule de perméase s'induisse est de plus en plus réduite ; ceci entraîne pour la glucuronidase une vitesse de synthèse de plus en plus ralentie au début et s'accéléralant de moins en moins vite. Il est du reste difficile de préciser si le taux de synthèse observé aux basses concentrations

($3.10^{-4}M$ avec le MU par exemple) représente la valeur maximum à l'équilibre ou s'il s'agit d'une phase où l'accélération est à peine perceptible. Quoiqu'il en soit, des cellules possédant le niveau maximum de perméase grâce à une induction préalable, sont capables de synthétiser la glucuronidase sans phase d'accélération préliminaire au taux maximum, même en présence d'une faible concentration d'inducteur ($MU\ 3.10^{-4}M$) grâce à la concentration élevée en inducteur que la perméase entretient d'emblée dans la cellule.

Nous avons vu plus haut que le glucose ajouté en même temps que l'inducteur inhibait totalement la synthèse de la glucuronidase, alors que dans une culture préalablement induite au maximum, l'inhibition par le glucose n'était que de 50 % environ. Il semble hautement probable qu'il faille, ici aussi, voir une manifestation de l'effet de préinduction dû à l'action de la perméase. En effet, COHN et collaborateurs (COHN 1957, COHN et HORIBATA 1959^a) ont mis en évidence le même phénomène avec la galactosidase et montré que l'inhibition par le glucose était réversible en présence de quantités suffisantes d'inducteur. Les auteurs expliquent de la manière suivante l'effet de préinduction avec le glucose. Lorsque le glucose est ajouté à une culture non induite, donc pratiquement dépourvue de perméase, la concentration d'inducteur intracellulaire est faible et l'inhibition des synthèses de la perméase et de la galactosidase par le glucose est sévère. Lorsque le glucose est, au contraire, ajouté à une suspension cellulaire pleinement induite, la perméase entretient un important niveau intracellulaire d'inducteur par rapport à celui du glucose et l'inhibition par le glucose ne peut, de ce fait, se manifester aussi fortement. Apparemment ce modèle est valable aussi pour notre système perméase-glucuronidase ; en tous cas nos résultats expérimentaux sont conformes aux prévisions qu'il entraîne.

Cet effet de "préinduction" mis en évidence et expliqué pour la première fois avec le système galactoside-perméase et galactosidase par MONOD et ses collaborateurs (BUTTIN 1955, MONOD 1956) semble donc être un phénomène assez général au sein des systèmes inductibles. COHN et ses

collaborateurs (COHN 1957, COHN et HORIBATA 1959^a) et NOVICK et WEINER (1957) ont montré qu'il se maintenait de manière rigoureusement stable ("maintenance" ou "maintien") pendant plus d'une centaine de générations cellulaires. Ils ont par ailleurs apporté des preuves solides de l'implication de la perméase dans ce processus, montrant en particulier que l'effet de préinduction et son maintien n'existait pas chez les souches génétiquement dépourvues de perméase, ou chez les cultures préinduites dans des conditions où la perméase ne peut se former (COHN et HORIBATA 1959^a).

b) Cinétique d'induction chez une souche (K12S) n'accumulant pas les glucuronides à l'intérieur de la cellule.

Cette deuxième catégorie d'expériences nous apportera une nouvelle preuve du rôle joué par la perméase dans l'induction.

Certaines souches, comme la souche K12S et les divers mutants de type sexuel F⁺ et Hfr qui en dérivent, ne possèdent pas le système accumulant les glucuronides à l'intérieur des cellules, tel qu'il a été décrit au chap. V. Le tableau 12 nous montre que la souche K12S, même induite par une concentration de MU dix fois supérieure à celle nécessaire à l'induction de ML30, accumule une quantité négligeable de TPU à l'intérieur de la cellule (1 % de la quantité accumulée par ML30). Les expériences réalisées jusqu'ici ne nous permettent pas d'affirmer que ces souches sont effectivement dépourvues de perméase, mais simplement que la faculté de concentrer les glucuronides à l'intérieur de la cellule leur fait défaut. Il se pourrait par exemple qu'elles possèdent effectivement un système transporteur spécifique, catalysant l'entrée des glucuronides dans la cellule ; mais elles n'accumuleraient pas ceux-ci, soit par suite d'une réaction de sortie accélérée par rapport à celle de ML30, soit par suite du défaut des réactions de couplage énergétique assurant le maintien du gradient de concentration intracellulaire. Il semble, en effet, que ces souches, capables comme nous allons le voir de synthétiser la glucuronidase en présence d'une concentration convenable d'inducteur, ne soient pas des mutants cryptiques au sens donné à ce terme pour les "lac" cryp-

tiques"^o (RICKENBERG, COHEN, BUTTIN et MONOD 1956). Bien qu'il semble raisonnable d'admettre que la cellule bactérienne n'est pas normalement perméable aux glucuronides (voir chap. V p.111), on constate, en effet, que ces souches K12S se développent fort bien sur MU comme seule source de carbone et avec un taux de croissance identique à celui de ML30. Ce n'est pas le cas pour les "lac⁻ cryptiques" ensemencés sur lactose.

TABLEAU VI - 12

ACCUMULATION COMPAREE DU TPU³⁵S CHEZ LES SOUCHES ML30 ET K12S d'E.COLI

Induction par	Souche ML30	Souche K12S
M U 10^{-3} M	50 (100 %)	0,2 (0,4 %)
M U 10^{-2} M	-	0,6 (1,2 %)

L'expérience a été réalisée selon les conditions générales décrites au chap. V.

Incubation de la suspension bactérienne : 15 minutes à 34° en présence de TPU³⁵S 10^{-3} M final.

Les chiffres indiquent le nombre de μ moles de TPU accumulés par g de poids sec bactérien.

• C'est-à-dire génétiquement dépourvus de perméase, mais inductibles pour la galactosidase.

Quoiqu'il en soit, l'absence de capacité d'accumuler les glucuronides inducteurs dans les cellules entraîne des particularités dans l'induction de la glucuronidase chez ces souches. La fig. 16 et le tableau 13 permettent de constater de notables différences dans la façon dont varie le taux différentiel de synthèse de la glucuronidase, chez K12S d'une part et chez ML30 d'autre part, en fonction de la concentration d'inducteur (MU). On voit qu'aux faibles concentrations d'inducteur ^{••} ($5 \cdot 10^{-4} \text{M}$), déjà saturantes pour le taux de synthèse de ML30, la souche K12S ne synthétise que peu d'enzyme : son taux différentiel de synthèse égale 16 % de celui de ML30 à la même concentration d'inducteur et 10 % du taux de synthèse maximum observé avec K12S. Par contre, à $5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ d'inducteur, la souche K12S a un taux de synthèse comparable (même un peu supérieur) à celui de ML30 et à $2 \cdot 10^{-2} \text{M}$ le taux de K12S est nettement supérieur au taux maximum de ML30. La souche K12S semble donc posséder une capacité de synthèse en glucuronidase supérieure à celle de ML30 aux fortes concentrations d'inducteur. Or malgré cela, à faible concentration d'inducteur la souche ML30 synthétise 6 fois plus d'enzyme que la souche K12S. Ceci s'explique aisément par le fait que ML30 concentre l'inducteur à un niveau intracellulaire bien supérieur à celui du milieu externe grâce à sa perméase ; la souche K12S par contre, dépourvue de cette faculté, ne peut avoir qu'une faible quantité d'inducteur intracellulaire à sa disposition. Aux plus fortes concentrations externes d'inducteur où la capacité de synthèse de ML30 est de toute manière saturée, ce phénomène ne joue plus.

En conclusion, la souche ML30, dotée du système accumulateur de glucuronides, manifeste vis-à-vis de l'inducteur une sensibilité bien supérieure à celle de la souche K12S, dépourvue de ce système. Ce résultat

•• Comme ML30, la souche K12S et ses parentes ont une activité pratiquement nulle en l'absence d'inducteur.

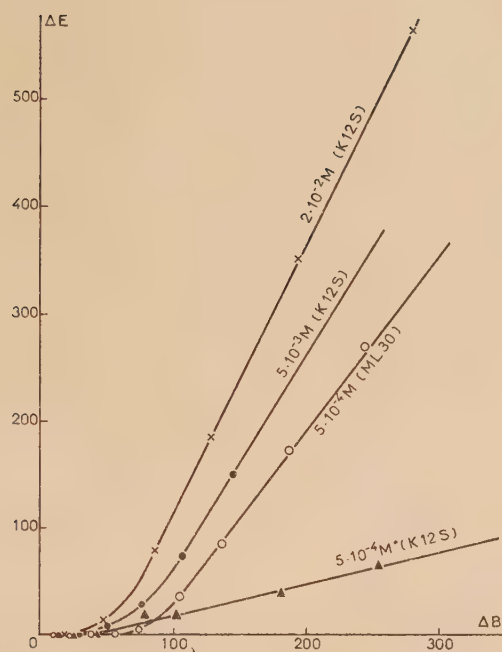


FIG. VI - 16

TAUX DIFFERENTIEL DE SYNTHÈSE DE LA GLUCURONIDASE INDUITE PAR MU A
DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS CHEZ E. COLI K12S (COMPARAISON AVEC LA
SOUCHE ML30 A $5 \cdot 10^{-4} M$ de MU)

TABEAU VI - 13COMPARAISON DES TAUX DIFFERENTIELS DE SYNTHÈSE DE LA GLUCURONIDASE
INDUITE PAR MU À DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS CHEZ ML30 & CHEZ K12S

Concentration externe d'inducteur	ML 30	K 1 2 S
$2 \cdot 10^{-2} M$	1400 (87 %)	2550 (100 %)
$5 \cdot 10^{-3} M$	1620 (100 %)	2010 (79 %)
$5 \cdot 10^{-4} M$	1620 (100 %)	255 (10 %)

Les taux différentiels de synthèse sont exprimés en $m\mu$ moles de PPU hydrolysé $\times$ heure⁻¹ $\times$ mg⁻¹ de poids sec bactérien.

Les valeurs entre parenthèses représentent les pourcentages des taux de synthèse maximum observés pour la souche en question.

est entièrement parallèle à celui des expériences de préinduction et confirme le rôle important joué par la perméase dans le mécanisme de l'induction.

RICKENBERG, COHEN, BUTTIN et MONOD (1956) et HERZENBERG (1959) ont décrit les propriétés de mutants "cryptiques" vrais pour le système

perméase-galactosidase, c'est-à-dire effectivement dépourvus de perméase quoique la synthèse de la galactosidase y soit, elle, inducible. Ces mutants sont, comme c'est le cas chez nous, bien moins sensibles aux basses concentrations d'inducteurs que la souche sauvage ; mais de plus, corollaire de l'absence totale de perméase, le taux différentiel de synthèse de la galactosidase est chez eux linéaire d'emblée, même pour de faibles teneurs d'inducteur. Or la phase préliminaire d'accélération du taux de synthèse de la glucuronidase existe chez K12S comme chez ML30 et l'accélération est de plus en plus faible au fur et à mesure que la concentration externe d'inducteur diminue ; cette observation semble confirmer l'hypothèse qu'en dépit du défaut d'accumulation des glucuronides chez K12S, il existe cependant un système spécifique responsable du transport des glucuronides à l'intérieur de la cellule et inducible par l'inducteur intracellulaire.

8. BIOSYNTHESE CONSTITUTIVE DE LA GLUCURONIDASE

Les diverses souches d'E. coli (ML30, K12S et apparentées) dont il a été question jusqu'ici ne synthétisaient la glucuronidase qu'en présence d'un inducteur ajouté à leur milieu de croissance en concentration adéquate. Nous avons vu qu'en l'absence d'inducteur, leur niveau glucuronidasique de base était presque toujours nul ou en tous cas très faible.

Il est cependant possible d'isoler à partir de ces souches des mutants "constitutifs", c'est-à-dire synthétisant spontanément la glucuronidase et à un taux élevé, en l'absence de tout inducteur exogène. Ces mutations sont spontanées, en tous cas dans la souche ML30, mais fort rares et il est nécessaire d'employer un milieu sélecteur pour les isoler au sein d'une population inducible.

Nous avons utilisé dans ce but l'acide aldobiouronique (galactosyl- β -glucuronide) extrait de la gomme arabique (voir chap. III p. 39). On sait que ce glucuronide est un substrat de la glucuronidase mais qu'il n'induit pas la biosynthèse de cet enzyme (voir chap. VI, tableau 1). Lorsqu'il est ajouté à un milieu de culture comme unique source de carbone il peut donc servir de substrat de croissance aux bactéries, mais seules

pourront se développer les cellules synthétisant la glucuronidase constitutivement. Comme l'acide aldobiouronique est en fait une très mauvaise source d'énergie (croissance très lente) il est nécessaire de laisser séjourner la culture plusieurs jours à 37°. Avec la souche ML30, on obtient d'aussi bons résultats avec ou sans l'aide d'agents mutagènes. Avec les souches Hfr ou F⁻ dérivant de K12 nous n'avons obtenu de mutants constitutifs que par irradiation aux rayons UV (dans des conditions donnant 1% de survivants) dans le premier cas et par traitement à l'acide nitreux (KAUDEWITZ 1959) dans l'autre cas. Les cultures ensemencées à faible densité (4 μ g de poids sec/ml) sur milieu synthétique liquide (25-50 ml) additionné d'acide aldobiouronique (5 mg/ml) sont agitées une nuit à 37°C ; elles effectuent ainsi une croissance limitée (100 μ g de poids sec bactérien/ml) sur l'acide glucuronique, impureté résiduelle de l'extraction de l'acide aldobiouronique (voir chap. III p. 41). On les laisse ensuite séjourner sans agitation à 37°C, puis entre le 10^e et le 50^e jour on isole sur gélose nutritive des cellules provenant de ces cultures et on y décèle selon les cas de 25 à 80 % de clones constitutifs pour la glucuronidase.

Ces mutants, sélectionnés pour la synthèse constitutive de glucuronidase, sont devenus simultanément constitutifs pour leur pouvoir d'accumulation intracellulaire des glucuronides (constitutifs pour la synthèse de la perméase), qu'il s'agisse de mutants de la souche ML30 à perméase inductible, ou de mutants de la souche K12S dépourvus de la faculté de concentrer les glucuronides dans leurs cellules.

Les souches ainsi obtenues synthétisent la glucuronidase, en l'absence de tout inducteur, en présence de sources de carbone variées (maltose, glucose, glycérol, succinate) et généralement à une vitesse de beaucoup supérieure à celle de la souche sauvage induite au maximum. Cette propriété est stable au cours des repiquages successifs des diverses souches. On assiste cependant à une baisse graduelle de l'activité spécifique globale de la population bactérienne au cours des générations ; cette diminution progressive est surtout sensible sur succinate et par contre

très peu marquée sur glucose. Elle est due à une sélection de mutants négatifs pour la glucuronidase au sein d'une population constitutive. Après 100 générations environ sur succinate il ne reste pratiquement plus que des cellules négatives dans la population bactérienne (alors que sur glucose dans les mêmes conditions, il reste une majorité de cellules constitutives). Ces cellules sont glucuronidase-négatives absolues, non inductibles même par de fortes doses de MU. Elles sont incapables de croître sur MU comme seule source de carbone, mais se développent parfaitement bien sur acide glucuronique. Cette mutation négative se maintient de manière durable au cours des générations successives. Il est probable que l'on a ici affaire à un phénomène de contre-sélection de mutants constitutifs, handicapés sur le plan énergétique par leur synthèse obligatoire de glucuronidase à forte dose, par des mutants glucuronidase-négatifs dont les besoins énergétiques sont plus faibles. Cette contre-sélection a plus de chances d'être efficace sur des substrats à taux de croissance relativement lent comme le succinate (0,8) que sur des substrats à taux de croissance rapide comme le glucose (1,3)°.

Nous avons étudié la biosynthèse de la glucuronidase chez la souche constitutive ML30 al (fig. 17). On constate que le taux différentiel de synthèse est linéaire et que la droite s'extrapole au point origine (droite O A). Ce taux de synthèse est près de 3 fois supérieur à celui de la souche ML30 induite au maximum par MU $5.10^{-3}M$ (4500 $m\mu$ moles de PPU hydrolysé/h/mg de poids sec, contre 1620). Nous avons d'autre part voulu savoir si le taux de synthèse de cette souche constitutive pouvait être augmenté par addition d'inducteur (courbe BCDE). Au point indiqué on ajoutait à la culture (en phase de croissance exponentielle et de taux de synthèse linéaire) du MU à la concentration de $5.10^{-3}M$. On voit que loin d'augmenter, le taux de synthèse s'infléchit presque aussitôt

° Le même phénomène a été constaté avec les souches constitutives pour la β -galactosidase (J. MONOD, observations inédites).

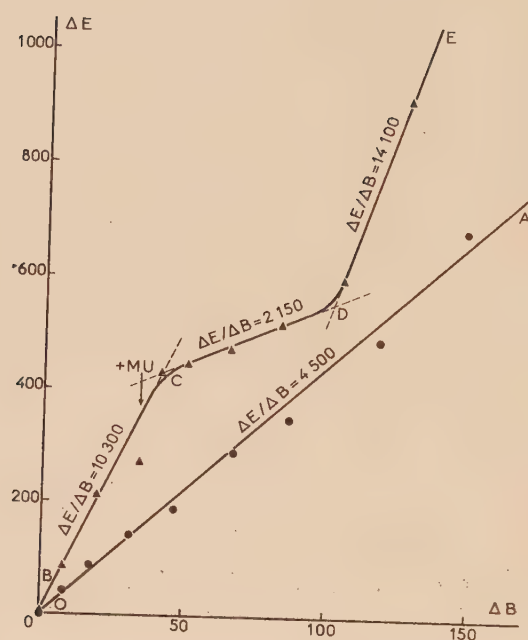


Fig. VI - 17

BIOSYNTHESE CONSTITUTIVE DE LA GLUCURONIDASE (ML 30 al)

(portion CD, valeur presque identique à celle de la souche ML30 induite par $MU\ 5.10^{-3}M$). Ceci ne dure que le temps d'un doublement de la masse bactérienne, puis le taux reprend une valeur un peu supérieure (portion DE) à celle qu'il avait avant l'addition de MU. On constate parallèlement un effet sur la croissance qui est ralentie (au moment de l'addition du MU passage d'un taux de croissance de 1,0 à un taux de 0,6 stable pendant tout le reste de l'expérience). Ce phénomène curieux demeure difficile à expliquer dans l'état actuel de nos connaissances. On trouve des résultats tout à fait analogues avec les souches constitutives pour la galactosidase en présence de lactose (MONOD et COHEN-BAZIRE 1953). Nous constatons par ailleurs que le taux différentiel de synthèse semble ici varier notablement d'une expérience à l'autre.

Mentionnons cependant que certaines souches isolées, généralement faiblement constitutives, semblent "superinductibles" par le MU ; c'est du moins ce que donne à penser le résultat de tests semi-quantitatifs préliminaires (conduits comme il est dit à propos des résultats du tableau 1, chap. VI, p.120).

Nous signalerons enfin que pour la plupart de ces souches constitutives, les activités spécifiques des cultures sur glucose (6 doublements) sont du même ordre de grandeur que celles de cultures sur un substrat comme le succinate ou le maltose. Des expériences cinétiques plus précises seront nécessaires pour confirmer ce résultat ; mais il semble que d'ores et déjà on puisse conclure que ces souches, constitutives pour la glucuronidase, sont insensibles à l'effet glucose.

9. CONCLUSIONS

Les expériences décrites dans ce chapitre autorisent un certain nombre de conclusions relatives au mode d'action de l'inducteur. Bien que la trame essentielle du processus d'induction, l'assemblage de la structure spécifique de la molécule enzymatique, demeure pour l'instant encore un phénomène mal connu, les résultats acquis ici permettent de préciser dans une certaine mesure la contribution spécifique de l'inducteur.

Nous avons établi que la fonction inductrice était strictement limitée aux corps possédant la structure glucuronyle dans son intégrité et engagée dans une liaison osidique. Ceci laisse supposer une étroite corrélation entre la structure de l'inducteur et celle de l'enzyme induit. On a vu au chapitre I que trois types d'hypothèses avaient été avancés pour expliquer ce phénomène, commun à tous les cas d'induction enzymatique étudiés :

1°) Hypothèses "fonctionnelles" : la synthèse de l'enzyme est liée à son fonctionnement métabolique. Seuls peuvent être inducteurs les véritables substrats de l'enzyme.

2°) Hypothèses "du complexe" : la synthèse de l'enzyme induit résulte de la combinaison spécifique de celui-ci avec son inducteur, qui déplace l'équilibre de la réaction Précurseur $\rightleftharpoons$ Enzyme dans le sens de la production de ce dernier. Seuls seront inducteurs les corps présentant une affinité complexante pour l'enzyme (qu'ils soient substrats ou non). Leur activité inductrice doit donc refléter cette affinité.

3°) Hypothèses "catalytiques" : l'inducteur se combine spécifiquement avec le centre formateur d'enzyme et active ainsi ce dernier. L'aptitude à l'induction d'une substance est indépendante aussi bien de son activité comme substrat que de son pouvoir de complexant vis-à-vis de l'enzyme considéré.

L'examen du tableau 14, où nous avons réuni quelques données particulièrement suggestives concernant quatre glucuronides, permet de réfuter immédiatement les deux premières hypothèses.

On voit que les deux thioglucuronides (TPrU et TPU) , bien que non hydrolysables par la glucuronidase (ni métabolisables de quelque façon que ce soit in vivo) sont néanmoins capables d'induire la synthèse de la glucuronidase. Ceci exclut formellement l'intervention du premier mécanisme proposé.

TABLEAU VI - 14

COMPARAISON DES PROPRIETES DE COMPLEXANT, DE SUBSTRAT ET D'INDUCTEUR
DE DIVERS GLUCURONIDES VIS A VIS DE LA GLUCURONIDASE (ML30)

Glucuronide	Affinité pour la per- méase ($\frac{1}{K}$ re- lation (2) chap.V p. 86)	Affinité pour la glucuroni- dase ($\frac{1}{K_s}$ rela- tion de HENRI- MICHAELIS)	Hydrolyse par la glucuro- nidase	Pouvoir induc- teur vis-à- vis de la glucu- ronida- se	Affinité inductri- ce vis-à- vis de la glucuroni- dase **
M U	0,17 $\times 10^4 M^{-1}$	0,28 $\times 10^2 M^{-1}$	+	1620	++
T P r U	0,25 $\times 10^4 M^{-1}$	2,2 $\times 10^2 M^{-1}$	0	445	+
T P U	1,1 $\times 10^4 M^{-1}$	9,1 $\times 10^2 M^{-1}$	0	207	+++
Acide aldobiou- ronique	affinité positive (non dé- terminée avec préci- sion)	$\# 10^3 M^{-1}$	+	$\# 0$	$\# 0$

- Taux différentiel de synthèse à $5 \cdot 10^{-3} M$ d'inducteur (sauf pour TPU : $10^{-2} M$) ; exprimé en $m\mu$ moles PPU hydrolysé $\times$ heure $^{-1}$ $\times$ mg $^{-1}$ de poids sec bactérien.

•• Selon la définition et la classification données p. 150.

Comparons à présent l'affinité des divers glucuronides pour la glucuronidase et leur pouvoir inducteur. Le MU, bien qu'ayant une affinité 8 et respectivement 30 fois plus faible que les deux thioglucuronides pour l'enzyme, est de loin meilleur inducteur de la glucuronidase que ceux-ci (4 à 8 fois selon le cas). Une différence de pénétration à l'intérieur de la cellule peut difficilement être invoquée en faveur du MU puisque celui-ci a par surcroît l'affinité la plus faible pour la perméase. Bien plus, un glucuronide comme l'acide aldobiouronique, qui pénètre dans la cellule et présente de l'affinité pour la glucuronidase, n'est pratiquement pas inducteur. La classification des glucuronides par ordre "d'affinité inductrice" telle que nous l'avons établie plus haut ne concorde pas non plus avec celle relative aux affinités pour l'enzyme. L'aptitude d'une substance à induire la formation de la glucuronidase ne suit pas son pouvoir complexant vis-à-vis de cet enzyme et le schéma proposé par l'hypothèse n° 2 doit donc être rejeté lui aussi.

La dissociation des propriétés d'inducteur d'avec celles de substrat et complexant d'un enzyme, telle que nous venons de l'établir, n'est donc compatible qu'avec l'hypothèse catalytique. Du reste, le fait qu'une substance comme le TPU, non métabolisable, se retrouve intacte après une incubation prolongée en présence de bactéries induites, suggère fortement que l'inducteur n'exerce qu'un rôle catalytique.

Ces résultats sont par ailleurs corroborés par les déductions que l'on peut tirer des études cinétiques. Nous avons vu que, mis à part la petite phase d'accélération, souvent négligeable et probablement due à l'intervention initiale de la perméase, la vitesse de synthèse de la glucuronidase restait constante pendant toute la durée du processus d'induction, et que cette vitesse s'annulait rapidement après élimination de l'inducteur. Cette linéarité et cette irréversibilité du phénomène excluent les hypothèses prévoyant la formation de l'enzyme à partir d'un déplacement d'équilibre précurseur - enzyme. En outre, cette vitesse de synthèse ne saurait demeurer constante si elle dépendait directement de la concentration d'enzyme ou de complexe enzyme - inducteur, puisque

justement la quantité d'enzyme présente par cellule augmente au cours de l'induction.

Si le rôle catalytique de l'inducteur ne paraît pas faire de doute, la nature exacte de ce rôle demeure bien entendu difficile à préciser sur la seule base des expériences citées. Il semble toutefois peu probable qu'il consiste à provoquer la synthèse de centres formateurs de glucuronidase, quelque hypothèse que l'on formule par ailleurs sur la nature de ceux-ci (matrices ribonucléiques par exemple). En ce cas, la cinétique de synthèse de l'enzyme serait d'allure exponentielle et non linéaire (à moins que le temps requis pour la formation d'un nombre saturant de centres formateurs soit très court). De plus, après élimination de l'inducteur, la synthèse de l'enzyme devrait se poursuivre un certain temps, au lieu de cesser presque immédiatement (à moins que les centres formateurs ne soient fort instables). Il semble donc - mais nos résultats ne permettent pas de l'affirmer de façon formelle - que le nombre des centres formateurs de glucuronidase soit constant, autant que leur activité, durant l'induction. Le rôle de l'inducteur serait donc de catalyser l'activation plutôt que la synthèse de ces centres formateurs d'enzyme. Ces diverses conclusions rejoignent du reste totalement celles qu'autorise l'étude de plusieurs autres cas de biosynthèse enzymatique induite (MONOD 1958^a et 1958^b).

En ce qui concerne la nature elle-même du processus d'induction, nos expériences n'apportent que peu d'informations. Nous voudrions cependant revenir sur deux sortes d'observations.

La structure spécifique de la glucuronidase induite, au moins partiellement complémentaire de celle de la molécule des inducteurs de cet enzyme, amène inévitablement à poser le problème suivant : une partie au moins de l'information structurale contenue dans la molécule des glucuronides inducteurs n'est-elle pas transférée, au cours du processus d'induction, au centre formateur de la glucuronidase et par conséquent à la glucuronidase elle-même ? Dans ce cas la structure de l'enzyme devrait, dans certains cas au moins, varier selon la nature de l'inducteur utilisé.

Or nous avons constaté au chapitre IV que la glucuronidase induite par le MU et la glucuronidase synthétisée en l'absence d'inducteur par la souche constitutive présentaient la même valeur du K_S pour le phénolphtaléineglucuronide ainsi que les mêmes K_i pour deux inhibiteurs compétitifs (propyl- et phénylthiogluconide). Ces résultats établissent par conséquent l'identité de la structure spécifique (caractérisée par son affinité pour ses complexants) des deux catégories d'enzyme. Si ces résultats négatifs ne permettent pas d'exclure totalement l'hypothèse d'un transfert d'information entre l'inducteur (MU) et la glucuronidase, ils la rendent cependant peu vraisemblable. Les mêmes conclusions négatives, reposant sur une gamme plus complète d'expériences, ont été formulées pour la β -galactosidase d'E. coli induite par divers inducteurs ou synthétisée constitutivement (MONOD et COHN 1952).

Ainsi que nous l'avons vu au chapitre I, la tendance moderne, étayée par de nombreux faits probants, est de considérer la biosynthèse enzymatique induite comme un cas particulier de "l'effet de répression". Autrement dit, la synthèse de chaque enzyme inductible est normalement réprimée par une substance spécifique, le répresseur, dont l'action inhibitrice est levée par celle d'un inducteur également spécifique. La mutation génique entraînant la synthèse constitutive d'un enzyme normalement inductible revient à la suppression de l'effet de répression (soit par perte du pouvoir de synthétiser le répresseur, soit par perte de la sensibilité au répresseur). Ceci explique que dans la plupart des cas, les souches constitutives, isolées à partir de souches inductibles pour un enzyme donné, synthétisent cet enzyme à un taux bien plus élevé que les souches inductibles (galactosidase d'E. coli (MONOD 1959), amylomaltase d'E. coli (COHEN-BAZIRE et JOLIT 1953), pénicillinase de B. cereus (KOGUT et coll. 1956), galactokinase et galactose-transférase d'E. coli (G. BUTTIN, observations inédites)). Or notre souche constitutive ML30 al ne fait pas exception à cette règle et synthétise la glucuronidase à une vitesse bien supérieure à celle de la souche sauvage (ML 30) induite au maximum. Il semble donc bien que la synthèse de la glucuronidase chez E. coli soit du

type naturellement réprimé, et que cette répression soit levée par l'action de l'inducteur.

En résumé nos résultats suggèrent fortement, s'ils ne permettent de l'affirmer sur la base de preuves directes, que la formation induite de la glucuronidase consiste en une synthèse de novo et irréversible de la molécule protéique à partir de ses constituants. Ils établissent que la propriété d'inducteur de la glucuronidase est totalement distincte de celle de substrat ou complexant de cet enzyme et tendent à confirmer le rôle catalytique de l'inducteur. Ils mettent en lumière le rôle important joué par la glucuronide-perméase dans le processus d'induction. Enfin ils contribuent à accréditer l'hypothèse que la synthèse de la glucuronidase, comme celle de tous les enzymes inductibles, est fondamentalement réprimée.

CHAPITRE VII

CONCLUSIONS GENERALES

Au terme de cet exposé, il nous reste à résumer les faits principaux que nos expériences ont permis de mettre en évidence, ainsi que les conclusions générales que nous avons pu en tirer .

Du point de vue biochimique, la β -glucuronidase d'Escherichia coli se caractérise comme un enzyme fort stable in vitro, comportant dans sa structure moléculaire un ou plusieurs groupements sulfhydryles inactivables de manière réversible. Nous ne lui avons pas trouvé d'ion activateur ni de coenzyme. L'activité de cet enzyme est liée dans une proportion de 98,5 % au moins à une espèce moléculaire homogène. Il hydrolyse les β -glucuronides (à un pH optimum de 7 pour le phénolphtaléineglucuronide), mais non les β -thioglucuronides. Il est complexé spécifiquement (de manière compétitive) par les osides à structure glucuronyle intacte, à l'exclusion des autres glycosides voisins. La glucuronidase d'E. coli a pu être purifiée 15 fois par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium et chromatographie sur cellulose activée. Le diagramme d'élution après chromatographie permet de conclure au haut degré de pureté de la préparation enzymatique obtenue. Les propriétés de l'enzyme purifié sont sensiblement les mêmes que celles de l'enzyme de l'extrait cellulaire brut.

Du point de vue physiologique, la β -glucuronidase d'E. coli est un enzyme intracellulaire, normalement inductible chez la souche sauvage. Nous avons cependant pu isoler des mutants "constitutifs", synthétisant cet enzyme en l'absence d'inducteur exogène. Chez les souches inductibles, le pouvoir de déclencher la synthèse de la glucuronidase est spécifiquement limité aux substances possédant la configuration glucuronyle intacte et engagée dans une liaison osidique. La nature de l'aglycone influe largement sur le pouvoir inducteur des

glucuronides, sans qu'il soit possible pourtant de dégager une loi bien définie de nos résultats.

L'arrêt de la formation de la glucuronidase en présence d'agents inhibiteurs de la synthèse des protéines, et en particulier d'analogues stériques d'acides aminés, montre que l'induction de la glucuronidase correspond selon toute vraisemblance à la synthèse d'une molécule protéique nouvelle à partir de ses éléments constitutifs.

L'utilisation de thioglucuronides, et en particulier du phényl- β -thioglucuronide (TPU), comme inducteurs de la glucuronidase chez E. coli a permis de préciser la nature du rôle spécifique de l'inducteur dans la synthèse induite de cet enzyme. En effet le TPU n'est pas utilisé par E. coli comme source de carbone et d'énergie, ses éléments ne sont pas incorporés dans les protéines bactériennes ; il n'est pas hydrolysable in vitro par la glucuronidase, et nous n'avons pu déceler aucune transformation de sa structure chimique au cours de son accumulation intracellulaire, ni au cours du processus d'induction de la glucuronidase. La synthèse de la glucuronidase induite par l'action du TPU constitue donc un exemple particulièrement net d'induction "gratuite", c'est-à-dire réalisée dans des conditions où le fonctionnement de l'enzyme ne peut influencer sur sa propre synthèse. Les propriétés d'inducteur, de substrat et de complexant de la glucuronidase ont pu être nettement dissociées : certains bons inducteurs n'ont que peu d'affinité pour l'enzyme (méthyl-glucuronide), d'autres glucuronides, doués d'une notable affinité pour la glucuronidase ne sont pas inducteurs (acide aldobionique), certains inducteurs enfin ne sont pas des substrats de la glucuronidase, bien que manifestant de l'affinité pour elle (thioglucuronides). Ces résultats, joints à ceux des études portant sur la cinétique de synthèse de la glucuronidase (taux de synthèse d'emblée constant dans bien des cas, irréversibilité du phénomène d'induction), ne sont compatibles qu'avec un mécanisme d'induction où l'inducteur joue un rôle catalytique. Enfin, l'identité des propriétés cinétiques in vitro de l'enzyme

produit par voie induite et par voie constitutive rend improbable l'hypothèse d'un transfert d'information structurale entre l'inducteur et l'enzyme induit.

Il existe chez E. coli un système capable d'accumuler à l'intérieur de la cellule les glucuronides du milieu externe et notamment le TPU. Le fonctionnement de ce système appelé glucuronide-perméase, est tributaire des réactions donatrices d'énergie. L'accumulation du TPU est réversible, il y a constamment échange entre le TPU intracellulaire et le TPU exogène. La vitesse d'entrée du TPU, de même que son niveau interne à l'équilibre, dépend de sa concentration externe selon une loi affectant la forme d'une isotherme de LANGMUIR ; les constantes en sont cependant différentes pour la vitesse d'entrée et le niveau interne atteint à l'équilibre. La synthèse de la perméase est inductible par les glucuronides et le taux différentiel de synthèse est linéaire ; la formation de la perméase est entièrement bloquée par les agents inhibiteurs de la synthèse protéique. L'accumulation du TPU est spécifiquement et compétitivement inhibée par les glucuronides, mais tous les autres glycosides, même les plus voisins, sont sans effet. Enfin, chez E. coli, la synthèse et le fonctionnement de la glucuronide-perméase sont totalement indépendants de ceux de la galactoside-perméase. Les données cinétiques du fonctionnement de la glucuronide-perméase permettent d'exclure l'intervention de récepteurs stoechiométriques dans le processus d'accumulation ; elles ne sont compatibles qu'avec un rôle catalytique de ce système.

Il semble donc difficile de contredire l'hypothèse que l'un des constituants au moins du système responsable de l'accumulation intracellulaire du TPU est une protéine, synthétisée de novo sous l'effet d'un glucuronide inducteur. Les propriétés de stéréospécificité, la cinétique d'action et de synthèse, l'individualité marquée de cette protéine, sont en tous points comparables à celles d'un enzyme classique. Plusieurs caractères de la glucuronide-perméase diffèrent cependant de ceux de la glucuronidase, et il apparaît vraisemblable que perméase et hydrolase correspondent ici à deux protéines nettement

distinctes.

Le rôle physiologique joué par la perméase au cours du processus d'induction de la glucuronidase est bien établi dans deux cas au moins. D'une part, les cellules d'une culture préalablement induite au maximum, puis débarrassée de l'inducteur, se montrent bien plus sensibles à une faible concentration externe d'inducteur^o que les cellules non préalablement induites : le taux différentiel de synthèse de la glucuronidase des cellules préinduites est, dans ces conditions, de beaucoup supérieur à celui des cellules non préinduites. D'autre part chez la souche K12S, incapable d'accumuler les glucuronides, le taux différentiel de synthèse de la glucuronidase à basse concentration externe d'inducteur (non saturante) est bien inférieur à celui de la souche ML30, pourvue d'une perméase normale ; aux fortes concentrations d'inducteur cependant, le taux de synthèse des deux souches devient comparable, plus élevé même pour la souche K12S que pour la souche ML30. Ces deux séries de résultats s'expliquent aisément par le fait que là où elle est présente, la perméase concentre activement le glucuronide inducteur à l'intérieur de la cellule, compensant sa faible concentration externe, et permet ainsi une abondante synthèse de glucuronidase. Par contre, chez les cellules non préinduites ou génétiquement dépourvues de système accumulateur, l'inducteur présent en faible concentration à l'extérieur ne pénètre qu'en faible quantité dans la cellule et ne peut y déclencher la synthèse de l'enzyme qu'à une vitesse réduite.

Ces observations illustrent le rôle fondamental que peut jouer la glucuronide-perméase dans l'orientation et la vitesse du métabolisme cellulaire. De son activité dépend en effet la vitesse de synthèse de la glucuronidase et par conséquent la vitesse d'attaque des glucuronides présents dans le milieu. Elle doit aussi commander indirectement l'efficacité de la suite du cycle de l'acide glucuronique chez E. coli ,

^o C'est-à-dire ne donnant normalement pas l'induction maximum.

car de la quantité de glucuronide pénétrant dans la cellule dépend la teneur en métabolites intermédiaires de cette séquence, par conséquent aussi leur vitesse de transformation, et probablement même la vitesse de synthèse des enzymes de ce cycle, puisqu'il semble bien que ceux-ci soient inductibles chez E. coli, de même que chez d'autres bactéries (Erwinia, Serratia, Aerobacter, Shigella ; voir chap. II, p. 19). Il est donc évident que la perméase doit exercer - dans des conditions appropriées de milieu extérieur - une influence prépondérante parmi les divers mécanismes qui contribuent à maintenir le potentiel chimique de la cellule dans un état d'équilibre compatible avec sa survie.

°

° °

BIBLIOGRAPHIE

- ABDEL-AKHER, M. et SMITH, F. (1951), J. Am. Chem. Soc. 73, 5859-5860.
- ANFINSEN, C. B. (1959), "The molecular basis of evolution", J. Wiley and Sons Inc., édit. New-York.
- ASHWELL, G., WAHBA, A. J. et HICKMAN, J. (1958), Biochim. Biophys. Acta 30, 186-187.
- BARBER, M. BROOKSBANK, B. W. L. et KUPER, S. W. A., J. Path. Bact. 63, 57-63. (1951)
- BEADLE, G. W. (1945), Chem. Rev. 37, 15-96.
- BEALL, D. et GRANT, G. A. (1952), Rev. Canad. Biol. 11, 51-52.
- BENZER, S. (1953), Biochim. Biophys. Acta, 11, 383-395.
- BERGER, A. (1955), Diplomarbeit, Chemisches Institut der Universität, Bonn (Allemagne)
- BERGER, A. (1956), Thèse de doctorat ès sciences, Chemisches Institut der Universität, Bonn (Allemagne).
- BOLLENBACK, G. N., LONG, J. W., BENJAMIN, D. G. et LINDQUIST, J. A. (1955), J. Am. Chem. Soc. 77, 3310-3315.
- BRAWERMAN, G. et YCAS, M. (1957), Arch. Biochim. Biophys. 68, 112-117.
- BRITT, E. M. et GERHARDT, Ph. (1958), J. Bact. 76, 281-287.
- BUEHLER, H. J., KATZMAN, P. A. et DOISY, E. A. (1949^a), Feder. Proc. 8, 189.
- BUEHLER, H. J., KATZMAN, P. A. et DOISY, E. A. (1951), Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. 76, (I), 672-676.
- BUEHLER, H. J., KATZMAN, P. A., DOISY, P. P. et DOISY, E. A. (1949^b), Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. 72, 297-299.
- BURGER, M., HEJMOVA, L. et KLEINZELLER, A. (1959), Bioch. J. 71, 233-242.
- BUSSARD, A., NAONO, S., GROS, F. et MONOD, J. (1960), C. R. Acad. Sci. 250, 4049-4051.
- BUTLER, C. L. et CRETCHER, L. H. (1929), J. Am. Chem. Soc. 51, 1519-1525.
- BUTTIN, G. (1955), Dipl. Etudes Supérieures, Fac. des Sciences, Paris.
- CHALLINOR, S. W., HAWORTH, W. N. et HIRST, E. L. (1931), J. Chem. Soc. 258-265.
- CLARK, W. M. et LUBS, H. A. (1916), J. Biol. Chem. 25, 479-510.
- CLARKE, P. H. et MEADOW, P. M. (1959), J. Gen. Microbiol. 20, 144-155.
- COHEN-BAZIRE, G. et JOLIT, M. (1953), Ann. Inst. Pasteur 84, 1-9.

- COHEN, G.N. et JACOB, F. (1959^a), C.R. Acad.Sci. 248, 3490-3492.
- COHEN, G.N. et JACOB, F. (1959^b), citée par MONOD, J. (1959).
- COHEN, G.N. et MONOD, J. (1957), Bact. Rev. 21, 169-194.
- COHEN, G.N. et MUNIER, R. (1959), Biochim.Biophys.Acta 31, 348-356.
- COHEN, G.N. et RICKENBERG, H.V. (1955^a), C.R. Acad. Sci. 240, 466-468.
- COHEN, G.N. et RICKENBERG, H.V. (1955^b), C.R. Acad.Sci. 240, 2086-2088.
- COHEN, G.N. et RICKENBERG, H.V. (1956), Ann.Inst.Pasteur 91, 693-720.
- COHN, M. (1957), Bact. Rev. 21, 140-168.
- COHN, M. (1958), dans "Sympos. on chemical basis of differentiation", W.D.McElroy et B.Glass, édit. The Johns Hopkins Press, Baltimore.
- COHN, M., COHEN, G.N. et MONOD, J. (1953), C.R.Acad.Sci. 236, 476-478.
- COHN, M., et HORIBATA, K. (1959^a), J. Bact. 78, 601-612.
- COHN, M. et HORIBATA, K. (1959^b), J. Bact. 78, 624-635.
- COHN, M. et MONOD, J. (1953), dans "Adaptation in Microorganisms", Cambridge Univ. Press, Londres, p.132-149.
- COHN, M., MONOD, J., POLLOCK, M.R., SPIEGELMAN, S et STANIER, R.Y. (1953), Nature (London) 172, 1096.
- COHN, M. et TORRIANI, A.M. (1951), C.R. Acad.Sci. 232, 115-117.
- COHN, M. et TORRIANI, A.M. (1952), J.of Immunol. 69, 471-491.
- COHN, M. et TORRIANI, A.M. (1953), Biochim.Biophys.Acta 10, 280-289.
- CYNKIN, M.A. et ASHWELL, G. (1959), Bact.Proc, p. 103.
- DANIELLI, J.F. (1952). Symp. Soc. Exptl. Biol. 6, 1-15 (Academic Press Inc. édit. New-York).
- DANIELLI, J.F. (1954), Symp.Soc.Exptl. Biol. 8, 502-516 (Academic Press Inc. édit. New-York).
- DANIELLI, J.F. (1954), 7th Symp.Colston Res.Soc. 14 p. (Colston Papers, Butterworths Scientific, édit. Londres).
- DAVIS, B.D. (1956), dans "Enzymes. units of biological Structure and Function" p. 509-522, O.H. Gaebler, édit. Academic Press Inc. New-York.
- DIENERT, F. (1900), Ann. Inst. Pasteur 14, 139-189.
- DOUDOROFF, M. (1951), Symp. on Phosphorus metabolism 1, 42-48 (W.D. McElroy et B.Glass édit., The Johns Hopkins Press, Baltimore).
- DOYLE, M.L. (1954), Feder.Proc. 13, 201.
- DOYLE, M.L. et KATZMAN, P.A. (1952), Feder.Proc. 11, 203-204.
- DOYLE, M.L., KATZMAN, P.A. et DOISY, E.A. (1955), J. Biol. Chem. 217, 921-929.

- DUBOS, R. (1940), Bact. Rev. 4, 1-16.
- DUCLAUX, E. (1889), "Traité de Microbiologie", vol. II, chap. 5., p. 84, et vol. III p. 25, Masson, Paris.
- DUERKSEN, J.D. et HALVORSON, H. (1958), J. Biol. Chem. 233, 1113-1120.
- DUERKSEN, J.D. et HALVORSON, H. (1959), Biochim. Biophys. Acta 36, 48-55.
- EGGLESTON, L.V. et KREBS, H.A. (1959), Biochem. J. 73, 264-270.
- ELLARD, G.A. et CLARKE, P.H. (1959), J. gen. Microbiol. 21, 338-343.
- EMERSON, S. (1945), Ann. Missouri Botan. Garden 32, 243-249.
- EULER, H. von et JANSSON, B. (1927), Z. physiol. Chem. 169, 226-234.
- FISCHER, E. et DELBRUCK, K. (1909), Chem. Ber. 42, 1476-1482.
- FISHMAN, W.H. (1950), dans "The Enzymes", J.B. Sumner et K. Myrbäck édit. vol. I, Part 1, 635-652 (Academic Press Inc. New-York).
- FISHMAN, W.H. (1955), Adv. in Enzymol. 16, 361-409.
- FISHMAN, W.H. et GREEN, S. (1957), J. Biol. Chem. 225, 453-463.
- FISHMAN, W.H., SPRINGER, B. et BRUNETTI, R. (1948), J. Biol. Chem. 173, 449-456.
- GALE, E.F. (1943), Bact. Rev. 7, 139-173.
- GALE, E.F. (1947), J. gen. Microbiol. 1, 53-76.
- GALE, E.F. (1954), Sympos. Soc. Exptl. Biol. 8, 242-253.
- GALE, E.F. et FOLKES, J.P. (1953), Biochem. J. 53, 493-498.
- GOMORI, G. (1946), Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. 62, 33-34.
- GORINI, L. et MAAS, W.K. (1957), Biochim. Biophys. Acta 25, 208-209.
- GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.J. et DAVID, M.M. (1949), J. Biol. Chem. 177, 751-766.
- GREEN, Jr, L.W., BURT, J.C., HESSELTINE, H.C. et ODELL, L.D. (1951), Am. J. Obstet. Gynecol. 61, 446-448.
- HALVORSON, H.O. et COHEN, G.N. (1958), Ann. Inst. Pasteur 95, 73-87.
- HALVORSON, H., FRY, W. et SCHWEMMIN, D. (1955), J. Gen. Physiol. 38, 549-573.
- HEIDELBERGER, M. et KENDALL, F.E. (1929), J. Biol. Chem. 84, 639-653.
- HELPERICH, B. et TURK, D. (1956), Chem. Ber. 89, 2215-2219.
- HELPERICH, B., TURK, D. et STOEBER, F. (1956), Chem. Ber. 89, 2220-2224.
- HERZENBERG, L. (1958), Biochim. Biophys. Acta 31, 525-538.
- HINSHELWOOD, C. (1946), "The chemical kinetics of the bacterial Cell.", Oxford, Clarendon Press.
- HOGNESS, D.S. (1959), Rev. Modern Physics 31, 256-268.

- HOGNESS, D.S., COHN, M. et MONOD, J. (1955), *Biochim. Biophys. Acta* 16, 99-116
- HOLZER, H. (1959), *Ann. Rev. Biochem.* 28, 187-189
- HORECKER, B.L. (1958), *Bull. Soc. Chim. Biol.* 40, 569-571.
- HORECKER, B.L. , THOMAS, J. et MONOD , J. (1959), *J. Biol. Chem.* 235, 1580-1585 et 1586-1590.
- HOROWITZ , J. et CHARGAFF, E. (1958), *Biochim. Biophys. Acta* 29, 222-223.
- HOROWITZ , J. et CHARGAFF, E. (1959), *Nature (London)* 184 , 1213-1215.
- JACOB, F. et MONOD, J. (1959), *C.R.Acad. Sci.* 249, 1282-1284.
- JACOB, F. et MONOD, J. (1961), *J. mol. Biol.* sous presse.
- JACOB, F. , PERRIN, D., SANCHEZ, C. et MONOD, J. (1960), *C.R. Acad. Sci.* 250, 1727-1729.
- JACOX, R.F. et CUSHING, G.L. (1953), *J. Bact.* 65, 700-705.
- KALCKAR, H.M. et de ROBICHON-SZULMAJSTER, H. (1959), *Bull. Soc. Chim. Biol.* 41, 1319-1320.
- KARSTROM, H. (1937), *Ergeb. Enzymforsch.* 7, 350-376.
- KARUNAIRATNAM, M.C. et LEVY, G.A. (1951), *Biochem.J.* 49, 210-215.
- KAUDEWITZ, F. (1959), *Z.f.Naturforsch.* 14^b, 528-537.
- KENNEDY, E.P. et BARKER, H.A. (1951), *Anal. Chem.* 23, 1033-1034.
- KEPES, A. (1960), *Biochim. Biophys. Acta* 40, 70-84.
- KEPES, A. et MONOD, J. (1957), *C.R. Acad. Sci.* 244, 809-811.
- KILGORE, W.W. et STARR, M.P. (1959^a), *Nature (London)* 183, 1412-1413.
- KILGORE, W.W. et STARR, M.P. (1959^b), *J. Biol. Chem.* 234, 2227-2235.
- KOENIGS, W. et KNORR, E. (1901), *Chem. Ber.* 1901², 957-981.
- KOGUT, M. et PODOSKI , E.P. (1953), *Biochem. J.* 55, 800-811.
- KOGUT, M. , POLLOCK, M.R. et TRIDGELL, E.J. (1956) *Biochem.J.* 62, 391-403.
- LE FEVRE, P.G. (1954), *Symp. Soc. Exptl. Biol.* 8, 118-135 (Academic Press Inc. édit. New-York).
- LEVENNE, P.A. et TIPSON , R.S. (1938), *J. Biol. Chem.* 125, 355-367 et 703-707.
- LEVY, G.A. et MARSH, C.A. (1959), *Adv. Carbohydr. Chem.* 14, 381-428.
- LEVY, G.A. et MARSH, C.A. (1960), dans "The Enzymes", 2° édit. , P. Boyer, H. Lardy et K. Myrbäck édit., Academic Press Inc., New-York, vol. 4 A, p. 397-407.
- LOISELEUR, J. (1954) "Techniques de laboratoire" t. II, p. 146.

- LUBIN, M. et KESSEL, D. (1960), *Biochim. Biophys. Res.Com.* 2, 249-255.
- McRORIE, R.A. et NOVELLI, G.D. (1958), *Nature (London)*, 182, 1504-1505.
- McRORIE, R.A., WILLIAMS, A.K. et PAYNE, W.J. (1959), *J. Bact.* 77, 212-216.
- MAGASANIK, B. (1957), *Ann. Rev. Microbiol.* 11, 221-252.
- MAGASANIK, B. (1958), dans "The Chemical Basis of Development", W.D. McElroy et B. Glass, édit., The Johns Hopkins Press, Baltimore, p. 485-490.
- MAGASANIK, B. , MAGASANIK, A.K. et NEIDHARDT, F.C. (1959), dans " A Ciba Symposium on the Regulation of Cell Metabolism", J. et A. Churchill Ltd, Londres, p. 334-349.
- MAGASANIK, B. , NEIDHARDT, F.C. et LEVIN, A.P. (1958), *Physiol. Adaptation Amer. Physiol. Soc. (Wash.)* 159-166.
- MARSH, C.A. (1954), *Biochem. J.* 58, 609-617.
- MARSH, C.A. (1955), *Biochem. J.* 59, 375-382.
- MAXWELL, R.E. et NICKEL, V.S. (1954), *Antibiotics and Chemotherapy*, 4, 289-295.
- MICHAELIS, L. (1931), *Biochem. Z.* 234, 139-141.
- MIWA, T. (1936), *Acta Phytochim. Japan* 9, 89.
- MONOD J. (1942), "Recherches sur la croissance des cultures bactériennes", (Thèse de doctorat ès sciences), Hermann édit., Paris.
- MONOD, J. (1943), *Ann. Inst. Pasteur* , 69, 179-181.
- MONOD, J. (1945), *Ann. Inst. Pasteur* 71 , 37-40.
- MONOD, J. (1947), *Growth* 11 , 223-289.
- MONOD, J. (1949^a), dans "Unités biologiques douées de continuité génétique" , C.N.R.S. édit. Paris, 181-199.
- MONOD, J. (1949^b), *Ann. Rev. Microbiol.* 3, 371-394.
- MONOD, J. (1955), *Exp. ann. Biochim. méd.* 17, 195-211 (Masson édit. Paris).
- MONOD, J. (1956) dans "Enzymes, Units of Biological Structure and Function", O.H. Gaebler édit. Academic Press Inc. , New-York, p. 7-28.
- MONOD, J. (1958^a), *Dunham Lectures, Harvard (USA)*, manuscrit inédit.
- MONOD J. (1958^b), *Rec. Trav. Chim.* 77, 569- 585.
- MONOD, J. (1959), dans "10. Coll. der Gesellsch.f.physiol. Chem.", Springer Verlag édit. Berlin, p. 120-145 ; *Angew. Chem.* 71, 685-691.

- MONOD, J. et AUDUREAU, A. (1946), Ann. Inst. Pasteur 72, 868-878.
- MONOD, J. et COHEN-BAZIRE, G. (1953^a), C.R. Acad. Sci, 236, 417-419.
- MONOD, J. et COHEN-BAZIRE, G. (1953^b), C.R. Acad. Sci. 236, 530-532.
- MONOD, J., COHEN-BAZIRE, G. et COHN, M. (1951), Biochim. Biophys. Acta, 7, 585-599.
- MONOD, J. et COHN, M. (1952), Adv. in Enzymol. 13, 67-119.
- MONOD, J. et COHN, M. (1953), VI Congrès Intern. Microbiol. Rome, symp. sur le métabolisme bactérien, p. 42-62.
- MONOD, J., HALVORSON, H.O. et JACOB, F. (1957), résultats inédits (cités par COHEN et MONOD, 1957).
- MONOD, J., PAPPENHEIMER Jr, A.M. et COHEN-BAZIRE, G. (1952), Biochim. Biophys. Acta 9, 648-660.
- MUNIER, R. et COHEN, G.N. (1956), Biochim. Biophys. Acta, 21, 592-593.
- MUNIER, R. et COHEN, G.N. (1959), Biochim. Biophys. Acta 31, 378-391.
- NAONO, S. et GROS, F. (1960^a), C.R. Acad. Sci. 250, 3527-3529.
- NAONO, S. et GROS, F. (1960^b), C.R. Acad. Sci. 250, 3889-3891.
- NEIDHARDT, F.C. et MAGASANIK, B. (1956^a), Biochim. Biophys. Acta, 21, 324-334.
- NEIDHARDT, F.C. et MAGASANIK, B. (1956^b), Nature (London) 178, 801-802.
- NEIDHARDT, F.C. et MAGASANIK, B. (1957), J. Bact. 73, 253-259.
- NELSON, N. (1944), J. Biol. Chem. 153, 375-380.
- NOVICK, A. et WEINER, M. (1957), Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 43, 553-566.
- PARDEE, A.B. (1959), dans "A Ciba Symposium on the Regulation of Cell Metabolism", J. et A. Churchill Ltd, édit. Londres, p. 295-304.
- PARDEE, A.B., JACOB, F. et MONOD, J. (1958), C.R. Acad. Sci. 246, 3125-3128.
- PARDEE, A.B., JACOB, F. et MONOD, J. (1959), J. Mol. Biol. 1, 165-178.
- PARDEE, A.B. et PRESTIDGE, L.S. (1956), Biochim. Biophys. Acta, 21, 406-407.
- PARDEE, A.B. et PRESTIDGE, L.S. (1958), Biochim. Biophys. Acta, 27, 330-344.
- PARDEE, A.B. et PRESTIDGE, L.S. (1959), Biochim. Biophys. Acta, 36, 545-547.
- PARTRIDGE, S.M. (1948), Biochem. J. 42, 238-250.
- PAYNE, W.J. et McRORIE, R.A. (1958), Biochim. Biophys. Acta 29, 466-467.

- PAYNE, W.J. et McRORIE, R.A. (1959), Bact.Proc. p.104.
- PERRIN, D., BUSSARD, A. et MONOD, J. (1959), C.R. Acad.Sci.249, 778-780.
- POLLOCK, M.R. (1950), Brit. J. Exptl. Pathol. 31, 739-753.
- POLLOCK, M.R. (1953), dans "Adaptation in Microorganisms", Cambridge University Press, Londres, p. 150-183.
- POLLOCK, M.R. (1956), J. Gen. Microbiol. 14, 90-108.
- POLLOCK, M.R. (1957), Biochem. J. 66, 419-428
- POLLOCK, M.R. (1959) dans "The Enzymes", P.D. Boyer, H. Lardy et K. Myrbäck édit., vol. I, chap. 13, p. 619-680 (Academic Press Inc. New-York).
- POLLOCK, M.R. et KRAMER, M. (1958), Biochem. J. 70, 665-681.
- POLLOCK, M.R. et TORRIANI, A.M. (1953), C.R. Acad. Sci. 237, 276-278.
- POLLOCK, M.R., TORRIANI, A.M. et TRIDGELL, E.J. (1956), Biochem.J. 62, 387-391.
- RICKENBERG, H.V., COHEN, G.N., BUTTIN, G. et MONOD, J. (1956), Ann. Inst. Pasteur 91, 829-857.
- ROBERTSON, J.J. et HALVORSON, H.O. (1957), J. Bact. 73, 186-198.
- ROBICHON-SZULMAJSTER, H. de (1960), Thèse de doctorat ès sciences; Faculté des Sciences, Paris.
- ROBINSON, J.J., BLINN, C.W. et FRANK, P.F. (1952), J. Bact. 64, 719-723.
- ROTMAN, B. et SPIEGELMAN, S (1954), J. Bact. 68, 419-429.
- SHILO, M. et STANIER, R.Y. (1957), J.Gen. Microbiol. 16, 482-490.
- SISTROM, W.R. (1958), Biochim. Biophys. Acta 29, 579-587.
- SMITH, E.E.B. et MILLS, G.T. (1950), Biochem. J. 47, XLIX.
- SOBER, H.A., GUTTER, F.J. et WYCKOFF, M.M. (1956), J. Am. Chem. Soc. 78, 756-763..
- SOMOGYI, M. (1945), J. Biol. Chem. 160, 61-68.
- SØRENSEN, S.P.L. (1912), Ergeb, Physiol. 12, 393.
- SPIEGELMAN, S. (1946), Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.11, 256-277.
- SPIEGELMAN, S. (1950), dans "The Enzymes", 1^o édit., J.B. Sumner et K. Myrbäck édit., Academic Press Inc. New-York, Vol. I, Part 1, p. 267-306.
- SPIEGELMAN, S. et HALVORSON, H.O (1954), J. Bact. 68, 265-273.
- SPIEGELMAN, S. et MORGAN, I. (1947), Arch. Biochem. 13, 113-125
- STADTMAN, E.R., NOVELLI, G.D. et LIPMANN, F. (1951), J. Biol. Chem.191 366-376.

- STANIER, R.Y. (1951), *Ann. Rev. Microbiol.* 5, 35-56
- STEPHENSON, M. (1947), *Ergeb. Enzymforsch.* 6 , 139-156 .
- STEPHENSON, M. et YUDKIN, J. (1936), *Biochem. J.* 30, 506-514.
- STOEBER, F. (1957^a), *C.R. Acad. Sci.* 244, 950-952.
- STOEBER, F. (1957^b), *C.R. Acad. Sci.* 244, 1091-1094.
- TAKAGI, Y., KANDA, M. et NAKATA, Y (1959), *Biochim. Biophys. Acta* 31
264-265.
- TALALAY, P., FISHMAN, W.H. et HUGGINS, C. (1946), *J. Biol. Chem.* 166
757-772.
- TERUI, G. et OKADA, H. (1951), *Osaka Univ. Tech. Rep.* 1, 293-307.
- TÜRK , D. (1955), Thèse de doctorat ès Sciences, Chemisches Institut
der Universität, Bonn (Allemagne).
- UMBREIT, W.W. , BURRIS, R.H. et STAUFFER, J.F. (1957), *Burgess Publ.* C°
Minneapolis/USA, p. 164.
- VOGEL, H.J. (1957^a), dans "The Chemical Basis of Heredity" W.D. Mc
Elroy et B. Glass édit. , The Johns Hopkins Press, Baltimore,
p. 276-296.
- VOGEL, H.J. (1957^b), *Proc. Nat. Acad. Sci. (US)* 43, 491-496.
- WAHBA, H.J., HICKMAN, J.W. et ASHWELL, G. (1958) *J. Am. Chem. Soc.* 80, 2594.
- WALLENFELLS, K., ZARNITZ, M.L. , LAUE, G. , BENDER, H. et KESER, M.
(1959), *Biochem. Z.* 331, 459-485.
- WARBURG, O. et CHRISTIAN, W. (1941), *Biochem. Z.* 310, 384-421.
- WENT, F.C. (1901), *Jahrb. f. wiss. Bot.* 36, 611-664.
- WIEJESUNDERA, S. et WOODS, D.D. (1953), *Biochem. J.* 55, VIII.
- WIESMEYER, H. et COHN, M. (1960), *Biochim. Biophys. Acta* 39 , 440-447.
- WISSEMAN, C et SMADEL, J.E. (1954), *J. Bact.* 67 , 662-679.
- WILLBRANDT, W (1954), *Symp. Soc. Exptl. Biol.* 8, 136-162 (Academic
Press Inc. édit. New-York).
- WILLIAMS, R.E.O. (1954), *J. Gen. Microbiol.* 10, 337-341.
- WORTMAN, J. (1882), *Z. physiol. Chem.* 6, 287.
- YATES, R.A. et PARDEE, A.B. (1957), *J. Biol. Chem.* 227, 677-692.
- YUDKIN, J. (1938), *Biol. Rev.* 13, 93, 106.
- ZABIN, I. KEPES, A. et MONOD , J. (1959), *Biochim. Biophys. Res. Com.*
1, 289-292.
- ZAJIC, J.E. (1959), *J. Bact.* 78, 734-735.

TABLE DES MATIERES

<u>AVANT-PROPOS</u>	I
 <u>CHAPITRE I</u>	
L'EVOLUTION PROGRESSIVE DE NOS CONNAISSANCES SUR LA BIOSYNTHESE DES ENZYMES	1.
 <u>CHAPITRE II</u>	
INTRODUCTION A L'ETUDE DE LA β -GLUCURONIDASE D'ESCHERICHIA COLI	15
 <u>CHAPITRE III</u>	
PREPARATION DE DIVERS GLUCURONIDES NECESSAIRES A L' ETUDE DU SYSTEME PERMEASE ET GLUCURONIDASE D'E. COLI..	22
1. Synthèse de thioglucuronides.....	24
2. Préparation d'un glucuronide vrai : le méthyl - β -D-glucuronide	37
3. Préparation d'un acide aldobiouronique : le galactosyl- β -D-glucuronide	39
4. Origine des autres glucuronides utilisés dans ce travail	42
 <u>CHAPITRE IV</u>	
PROPRIETES ET PURIFICATION DE LA β -GLUCURONIDASE D'E. COLI	43
1. Introduction	43
2. Purification de la β -glucuronidase d'E. coli ML30 al	47
3. Propriétés de la β -glucuronidase d'E. coli in vitro	50
4. Conclusions.	63

CHAPITRE V

ETUDE DE LA GLUCURONIDE-PERMEASE D'E. COLI	68
1. Introduction : les perméases des microorganismes	69
2. Matériel et techniques utilisés pour l'étude de la glucuronide-perméase	71
3. Mise en évidence de l'accumulation intracellulaire de thiophénylglucuronide. Caractéristiques générales du phénomène.....	74
4. Réversibilité, équilibre, saturation de l'accumulation	82
5. Inductibilité du système accumulateur de thiophénylglucuronide	95
6. Spécificité d'induction et de fonctionnement du système accumulateur de thiophénylglucuronide	97
7. Discussion des résultats obtenus et conclusions.	109

CHAPITRE VI

BIOSYNTHESE DE LA β -GLUCURONIDASE CHEZ E. COLI	116
1. Introduction	116
2. Matériel et techniques	116
3. Mise en évidence de l'inductibilité de la glucuronidase. Spécificité de l'induction	119
4. La "gratuité" dans l'induction	123
5. Etude cinétique de la synthèse de la glucuronidase chez E. coli ML30	130
6. Inhibition de la biosynthèse induite de la glucuronidase chez E. coli ML30	153
7. Le rôle de la glucuronide-perméase dans le processus d'induction de la glucuronidase	166
8. Biosynthèse constitutive de la glucuronidase ...	175
9. Conclusions	179

CHAPITRE VII

CONCLUSIONS GENERALES	185
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	190
<u>TABLE DES MATIERES</u>	198

DEUXIEME THESE

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

"Propriétés et fonctions de l'acide ribonucléique "messenger"

Vu et approuvé:
Paris, le 16 Mai 1961
Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PERES

Vu
et Permis d'imprimer:

Le Recteur de l'Académie
de Paris

Jean SARRAILH

